

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**



Gabrielle de Freitas Mapa

**FUSÕES GÊNICAS EM PACIENTES COM CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO: um  
estudo clínico e funcional**

Belo Horizonte

2025

Gabrielle de Freitas Mapa

**FUSÕES GÊNICAS EM PACIENTES COM CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO: um  
estudo clínico e funcional**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Genética da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho

Coorientadoras:

Profa. Dra. Carolina Pereira de Souza Melo

Profa. Dra. Letícia da Conceição Braga

Belo Horizonte

2025

043

Mapa, Gabrielle de Freitas.

Fusões gênicas em pacientes com câncer epitelial de ovário: um estudo clínico e funcional [manuscrito] / Gabrielle de Freitas Mapa. – 2025.

106 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho. Coorientadoras: Profa. Dra. Carolina Pereira Melo; Profa. Dra. Letícia da Conceição Braga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Câncer de Ovário. 3. Carcinoma Epitelial do Ovário. 4. Fusão Gênica. I. Carvalho, Maria Raquel Santos. II. Melo, Carolina Pereira. III. Braga, Letícia da Conceição. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA - SECRETARIA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA

#### GABRIELLE DE FREITAS MAPA

Às nove horas do dia **24 de fevereiro de 2025**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Fusões Gênicas em Pacientes Com Câncer Epitelial de Ovário: Um Estudo Clínico e Funcional**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Maria Raquel Santos Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Maria Raquel Santos Carvalho	UFMG	<b>APROVADA</b>
Dra. Letícia da Conceição Braga	Instituto Mário Penna	<b>APROVADA</b>
Dra. Carolina Pereira de Souza Melo	Instituto Mário Penna	<b>APROVADA</b>
Dra. Luciane Sussuchi da Silva	CPOM	<b>APROVADA</b>
Dra. Luciana Maria Silva	Fundação Ezequiel Dias	<b>APROVADA</b>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2025.**

Dra. Maria Raquel Santos Carvalho

Dra. Letícia da Conceição Braga

Dra. Carolina Pereira de Souza Melo

Dra. Luciane Sussuchi da Silva

Dra. Luciana Maria Silva

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Leticia da Conceição Braga, Usuário Externo**, em 26/02/2025, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Sussuchi da Silva, Usuário Externo**, em 26/02/2025, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Pereira de Souza Melo, Usuária Externa**, em 26/02/2025, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 27/02/2025, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 10/03/2025, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4004700** e o código CRC **B4BAAE40**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**"FUSÕES GÊNICAS EM PACIENTES COM CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO: UM ESTUDO CLÍNICO E FUNCIONAL"**

**GABRIELLE DE FREITAS MAPA**

**DISSERTAÇÃO APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELOS PROFESSORES:**

Profa. Luciana Maria Silva  
Fundação Ezequiel Dias

Profa. Luciane Sussuchi da Silva  
CPOM

Profa. Letícia da Conceição Braga - Coorientadora  
FUNDEP

Profa. Carolina Pereira de Souza Melo - Coorientadora  
Instituto Mário Penna

Profa. Maria Raquel Santos Carvalho - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Leticia da Conceição Braga, Usuário Externo**, em 26/02/2025, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Sussuchi da Silva, Usuário Externo**, em 26/02/2025, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Pereira de Souza Melo, Usuária Externa**, em 26/02/2025, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 27/02/2025, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 10/03/2025, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4004701** e o código CRC **CD86A3F8**.

Referência: Processo nº 23072.211470/2025-15

SEI nº 4004701

“Dedico este trabalho aos meus pais, que sob muito sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra.”

## AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos àquele sem o qual nada disso seria possível: agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, que, desde sempre, não apenas me incentivaram, mas também possibilitaram minha formação acadêmica. Sem medir esforços, me deram muito além do mínimo, tornando o caminho mais fácil, apesar dos inúmeros desafios enfrentados. Mãe, obrigada pelo exemplo, você é o maior de todos. Obrigada por tudo que abdicou para garantir que nunca me faltasse nada, nem mesmo o conforto. Pai, obrigada por enxergar meu sucesso como o seu sonho, me colocando acima de você tantas vezes, obrigada por ser aconchego.

Agradeço à minha irmã, por ser um exemplo de coragem e determinação na busca pelo que é certo. Você é mãe, trabalhadora, estudante e, ainda assim, nunca me faltou como irmã e amiga.

Agradeço à minha sobrinha, Luísa, por me lembrar pelo que vale a pena lutar.

Agradeço ao Du, que tantas vezes me apoiou com sua presença, prestatividade e, mesmo sem saber o melhor caminho, me mostrando que tudo daria certo. Obrigada pela paciência nesse período conturbado.

Aos meus amigos da UFOP, Vitor, Andressa e Murilo, obrigada pelo colo, por me deixarem desabafar e por sempre me entenderem.

À Bela, obrigada por sempre ser apoio e aconchego. Agradeço também por compartilhar comigo sua família. Isadora, Chico, Sueli e Igor, vocês foram a minha família em BH. Obrigada por me receberem.

À Larissa, obrigada pelas conversas acompanhadas de cerveja e, quase sempre, de um jogo do Galo. Você deixou meus dias mais leves. Joana, obrigada pelos encontros de última hora, repletos de risadas e lembranças. Alessandra, obrigada pelos conselhos durante esse período, mas, acima de tudo, por esses anos de amizade

Agradeço aos meus primos, Adriano, Fabrício, Fabiano, Karine, Gustavo, Bruno, Cíntia e Mateus. Tivemos perdas inestimáveis. Éramos 12, agora somos 10, depois da partida de Guilherme e Douglas. Vocês, mesmo sem saber, me ajudaram a lidar com meu luto nesses últimos dois anos, fazendo com que eu encontrasse forças para seguir, apesar da dor da perda.

Gui e Douglas, vocês não imaginam como está difícil seguir sem vocês. Recuperar as forças e continuar trabalhando no mestrado depois que se foram foi um grande desafio, mas necessário. De certa forma, este trabalho também é dedicado a você, Gui, para que, num futuro não tão distante, outras pessoas tenham acesso aos recursos que você não teve.

Agradeço ao Laboratório de Genética Humana e Médica da UFMG, onde fui muito bem recebida. Agradeço à Marlene, técnica do laboratório, pelas inúmeras horas de experimentos e conversas. Seu papel na minha formação será sempre lembrado. Agradeço, de forma geral, a todos os colegas de laboratório que, direta ou indiretamente, contribuíram com o projeto. De maneira especial, agradeço à Sarah Henz, minha companheira nas disciplinas e nos momentos de angústia.

Agradeço ao Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão, onde vivi grande parte desses dois anos. Sou grata por ter convivido com profissionais tão competentes em um ambiente de trabalho acolhedor. Agradeço a toda a equipe: Carol, Jorge, Ramon, Fábio, Letícia, Bryan, Izabela, Pamela, Tadeu, Thalía, Rafaela, Níli, Brenda, Bárbara, Diogo, Kassiane, Pedro, Ana, Beatriz, Ana Carolina, Francisco, Arthur, Mavi, Malu, Sarah, Marcela e todos os outros, que sempre se dispuseram a ajudar e compartilharam conhecimento. Além disso, agradeço pelas inúmeras gargalhadas em momentos de descontração, que fizeram toda a diferença, deixando nossos dias mais leves. Que a competência dessa equipe e o clima de harmonia nunca se percam.

Agradeço à FUNED e a toda a equipe do Laboratório de Biologia Celular, em especial Bianca Carvalho, Bianca Rocha, Júlia e Bárbara, que me acolheram tão bem. Luciana, te agradeço por me receber de portas abertas.

Agradeço ao Carlos Araújo, por sua enorme contribuição na realização do docking e disponibilidade para sanar tantas dúvidas.

De forma muito especial, agradeço às três cientistas que desenvolveram este projeto comigo. Receber a orientação de mulheres tão extraordinárias, que se destacam em suas respectivas áreas, foi um verdadeiro privilégio. Saio mais inspirada e fortalecida.

Às minhas coorientadoras, Carolina Melo e Letícia Braga, agradeço pelo conhecimento compartilhado e pela oportunidade. Letícia, seus conselhos profissionais foram ouvidos com atenção, te admiro e me inspiro em você. Carol, te agradeço por me acompanhar tão de perto, atenta a todas as minhas demandas acadêmicas, mas além do âmbito profissional, agradeço

também pelos infinitos áudios quando tudo parecia tão nebuloso e complicado. Você fez uma grande diferença ao longo desse processo.

À minha orientadora, Maria Raquel, agradeço pela oportunidade, confiança e liberdade que me concedeu. Você não apenas me mostrou os caminhos, mas também me deu o espaço para que eu os trilhasse com autonomia e aprendizado. Sua inteligência é brilhante, e tenho profundo respeito e admiração por você.

Agradeço ao Instituto Mário Penna pela infraestrutura impecável que possibilitou a realização deste projeto.

Agradeço, com todo meu carinho, às pacientes que, mesmo em um momento tão delicado, se disponibilizaram a participar da pesquisa, confiando que os frutos desse estudo seriam para o futuro, não para elas, mas para todas as que virão.

Sou grata à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Genética por todo o aprendizado que me proporcionaram. A todos os professores, servidores técnico-administrativos e terceirizados, meu muito obrigada pela dedicação e apoio.

Agradeço também ao PRONON (NUP: 25000.020618/2019-35) e à RED-00059-23 pelo suporte financeiro imprescindível.

Por fim, meu mais sincero agradecimento à CAPES, pelo fomento que tornou possível o desenvolvimento deste projeto, e por apoiar a educação e a pesquisa de tantas pessoas.

## RESUMO

O câncer de ovário é a oitava neoplasia mais comum entre mulheres e o tumor ginecológico mais letal globalmente. Fusões gênicas são consideradas precursores, biomarcadores e/ou alvos terapêuticos em diversos tumores, ajudando no diagnóstico e manejo dos pacientes. Neste estudo, foram avaliadas amostras de tecido tumoral fixadas em formaldeído e incluídas em parafina (FFPE) de 24 pacientes com câncer epitelial de ovário atendidas no Hospital Luxemburgo do Instituto Mário Penna entre 2015 a 2019. O DNA e RNA extraídos dessas amostras foram sequenciados utilizando o painel *QIAseq Multimodal Pan-Cancer* (Qiagen). A detecção das fusões gênicas foi feita com o programa *QIAGEN CLC Genomics Workbench 23*. Realizou-se PCR convencional de PCR *hemi-nested* para validação das fusões. O *docking Molecular* foi realizado pelo programa MOE, e demais análises *in silico* foram feitas a partir de programas, ferramentas e bancos de dados disponíveis publicamente. Cinco fusões foram identificadas em cinco pacientes: *KDM7A-BRAF*, *BRAF-TMEM178B*, *BRCA1-VAT1*, *NOTCH2NLB-NOTCH2* e *NOTCH2-NOTCH2NLB*, sendo a última a única recorrente, presente em três dos cinco casos. Contudo, fusões envolvendo *NOTCH2* e *NOTCH2NLB* foram desconsideradas devido à alta probabilidade de se tratarem de falso-positivos em razão da homologia entre estes genes. A fusão *BRCA1-VAT1* pode impactar o reparo por recombinação homóloga, inibir apoptose e favorecer a síntese de lipídios, contribuindo para o aumento da demanda energética tumoral. Já as fusões *BRAF-TMEM178B* e *KDM7A-BRAF* podem desregular vias de sinalização cruciais para a proliferação celular, como MAPK/ERK e PI3K, além de afetar a regulação epigenética por meio da modificação na condensação da cromatina. As análises sugerem que as fusões *BRCA1-VAT1*, *BRAF-TMEM178B* e *KDM7A-BRAF* poderiam contribuir para a carcinogênese ovariana, especialmente em casos de recidiva, já que, no tumor primário, sua frequência é reduzida – exceto para *BRAF-TMEM178B*, detectada em alta frequência. Como próximos passos será importante uma caracterização mais detalhada do perfil de mutações dos tumores das pacientes. Os achados deste estudo reforçam a importância da caracterização de fusões gênicas em tumores ovarianos, destacando seu papel na biologia do câncer epitelial de ovário e a necessidade de investigações adicionais para compreender seu impacto e potenciais implicações clínicas.

**Palavras-chave:** Câncer de Ovário; Câncer Epitelial de Ovário; Fusões Gênicas

## ABSTRACT

Ovarian cancer is the eighth most common malignancy among women and the most lethal gynecologic tumor worldwide. Gene fusions are considered precursors, biomarkers, and/or therapeutic targets in various tumors, aiding in patient diagnosis and management. In this study, formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue samples from 24 patients with epithelial ovarian cancer treated at Hospital Luxemburgo of the Instituto Mário Penna between 2015 and 2019 were analyzed. DNA and RNA extracted from these samples were sequenced using the QIAseq Multimodal Pan-Cancer panel (Qiagen). Gene fusion detection was performed using the QIAGEN CLC Genomics Workbench 23 software. Conventional PCR and hemi-nested PCR were conducted for fusion validation. Molecular docking was performed using the MOE software, and additional *in silico* analyses were carried out using publicly available programs, tools, and databases. Five fusions were identified in five patients: KDM7A-BRAF, BRAF-TMEM178B, BRCA1-VAT1, NOTCH2NLB-NOTCH2, and NOTCH2-NOTCH2NLB, with the latter being the only recurrent fusion, present in three of the five cases. However, fusions involving NOTCH2 and NOTCH2NLB were disregarded due to the high likelihood of being false positives resulting from gene homology. The BRCA1-VAT1 fusion may impact homologous recombination repair, inhibit apoptosis, and promote lipid synthesis, contributing to increased tumor energy demand. Meanwhile, the BRAF-TMEM178B and KDM7A-BRAF fusions may dysregulate key signaling pathways involved in cell proliferation, such as MAPK/ERK and PI3K, in addition to affecting epigenetic regulation through chromatin condensation modification. The analyses suggest that the BRCA1-VAT1, BRAF-TMEM178B, and KDM7A-BRAF fusions could contribute to ovarian carcinogenesis, particularly in recurrent cases, as their frequency is low in primary tumors—except for BRAF-TMEM178B, which was detected at high frequency. As a next step, a more detailed characterization of the mutational profiles of the patients' tumors will be crucial. The findings of this study reinforce the importance of characterizing gene fusions in ovarian tumors, highlighting their role in the biology of epithelial ovarian cancer and the need for further investigations to understand their impact and potential clinical implications.

**Keywords:** Ovarian Cancer; Epithelial Ovarian Cancer; Gene Fusions

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características compartilhadas entre os diversos tipos de câncer.....	22
Figura 2. Modelo dualístico de Kurman e Shi para CEO.....	25
Figura 3. Mecanismos geradores de fusões gênicas.....	27
Figura 4. Consequências geradas por fusões gênicas.....	28
Figura 5. Cromossoma artificial.....	34
Figura 6. Fusão Gênica BRCA1-VAT1 .....	42
Figura 7. Domínios Conservados na proteína quimérica BRCA1-VAT1 .....	43
Figura 8. Estrutura tridimensional do domínio BRCT .....	44
Figura 9. Alinhamento dos resíduos conservados BRCT_rpt2_BRCA1 .....	45
Figura 10. Diferenças estruturais entre as proteínas BRCA1 e BRCA1-VAT1.....	49
Figura 11. Alinhamento sequência BRCT selvagem x sequência quimérica.....	50
Figura 12. Sobreposição das estruturas 3D dos domínios BRCTs selvagem e quimérico.....	51
Figura 13. Sobreposição entre a estrutura ID 4JLU e o domínio quimérico com o ligante Abraxas. ....	52
Figura 14. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com a ligante Abraxas .....	54
Figura 15. Sobreposição entre a estrutura dos domínios cristalizados BRCTs_BRCA1 e os domínios BRCTs_BRCA1 quimérico com o ligante BACH1 .....	55
Figura 16. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com ligante BACH1 .....	56
Figura 17. Sobreposição entre a estrutura dos domínios cristalizados BRCTs_BRCA1 e os domínios BRCTs_BRCA1 quimérico com ligante CtIP.....	57
Figura 18. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com ligante CtIP.....	58
Figura 19. Sobreposição entre a estrutura dos domínios cristalizados BRCTs_BRCA1 e os domínios BRCTs_BRCA1 quimérico com o ligante ACCA.....	59
Figura 20. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com ligante ACCA .....	60
Figura 21. Fusão Gênica BRAF-TMEM178B .....	64
Figura 22. Predição da estrutura 3D da proteína quimérica BRAF-TMEM178B.....	65
Figura 23. Domínios conservados BRAF.....	66
Figura 24. Cascata de sinalização MAPK/ERK.....	67
Figura 25. Ativação atípica da via MAPK/ERK e PI3K.....	68
Figura 26. Fusão Gênica KDM7A-BRAF.....	70
Figura 27. Predição da estrutura 3D da proteína quimérica KDM7A-BRAF .....	70
Figura 28. Amplificação do alvo para a fusão BRCA1-VAT1 na biblioteca de sequenciamento .....	74
Figura 29. Amplificação do alvo para a fusão BRCA1-VAT1 por PCR hemi-nested.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Desenho dos primers para as fusões reportadas.....	39
<b>Tabela 2.</b> Primers para a PCR <i>hemi-nested</i> .....	40
<b>Tabela 3.</b> Propriedades físico-químicas BRCA1 X BRCA1-VAT1.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abraxas	Proteína Abraxas
ACCA	Acetil-CoA Carboxilase
AKT	Quinase de serina/treonina AKT
BACH1	BTB and CNC homology
BRAF	Proto-oncogene B-Raf, quinase de serina/treonina
BRAF-TMEM178B	Fusão entre o gene BRAFe o gene TMEM178B
BRCA1-VAT1	Fusão entre o gene BRCA1 e o gene VAT1
BRCT_rpt1	Repetição 1 do domínio BRCT
BRCT_rpt2	Repetição 2 do domínio BRCT 2
CA125	Antígeno de câncer 125
CEO	Câncer epitelial de ovário
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FISH	hibridização fluorescente <i>in situ</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
HGSOC	Carcinoma de ovário seroso de alto grau
IHC	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KDM7A-BRAF	Fusão entre o gene KDM7Ae o gene BRAF
KRAS	Homólogo do oncogene viral Kirsten rat sarcoma

LGSOC	Carcinoma de ovário seroso de baixo grau
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MEK	Quinase de mitógeno ativado
miRNAs	MicroRNAs
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
mRNA	RNA mensageiro
NGS	Sequenciamento de nova geração
NOTCH2NLB-NOTCH2	Fusão entre o gene NOTCH2NLB e o gene NOTCH2
NOTCH2-NOTCH2NLB	Fusão entre o gene NOTCH2 e o gene NOTCH2NLB
NTC	<i>No Template Control</i>
OVCC	Carcinoma de células claras de ovário
PARP	Inibidores de Poli (ADP-ribose) polimerase
PCO37	Paciente 37
PCO52	Paciente 52
PCO53	Paciente 53
PCO65	Paciente 65
PCO83	Paciente 83
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB-RCSB	<i>Protein Data Bank</i>
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PTEN-PI3K-AKT	Via de sinalização envolvendo os genes PTEN PI3K e AKT
RAS	oncogênica Ras
RNA	Ácido ribonucleico

RNAi	RNA de interferência
RTKs	Receptores tirosina quinase transmembranares
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
S-score	<i>Scoring system</i>
STKc	Domínio serina/treonina quinase
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TP53	Proteína do tumor p53
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Câncer .....	21
1.2 Câncer de ovário .....	23
1.3 Fusões gênicas .....	26
1.4 Objetivos.....	29
1.4.1 Objetivo Geral .....	29
1.4.2 Objetivos Específicos.....	29
1.5. Justificativa e relevância.....	30
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
2.1 Desenho experimental.....	30
2.2 Aspectos éticos .....	31
2.3 Construção de bibliotecas de cDNA e Sequenciamento .....	31
2.3.1 Detecção de fusões gênicas .....	32
2.3.2 Refinamento dos potenciais genes de fusão .....	33
2.4 Caracterização <i>in silico</i> das fusões.....	35
2.5 Docking <i>BRCA1-VAT1</i> .....	35
2.5.1 Alinhamento e predição da estrutura tridimensional por homologia .....	36
2.5.2 Docking molecular .....	37
2.6 Validação das Fusões.....	37
2.6.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	37
2.6.2 PCR Convencional .....	37
2.6.3 PCR Hemi-nested.....	40
2.6.4 Purificação do produto da <i>hemi-nested</i> PCR para sequenciamento Sanger .....	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1 Caracterização <i>in silico</i> das fusões.....	41
3.1.1 Fusão <i>BRCA1-VAT1</i> .....	42
3.1.2 Fusão <i>BRAF-TMEM178B</i> .....	63
3.1.3 Fusão <i>KDM7A-BRAF</i> .....	69
3.2 Validação das fusões.....	72
3.3 Relação entre as Fusões Gênicas e Perfis Clínico-Patológicos das pacientes com CO.....	75
3.3.1 A paciente PCO65 .....	75
3.3.2 A paciente PCO 37.....	77
4. CONCLUSÕES.....	78

5. LIMITAÇÕES .....	78
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
7. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS E BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICE A - Sequências do mRNA; CDS e tradução para a fusão <i>BRCA1-VAT1</i> .....	86
APÊNDICE B - Sequências do mRNA; CDS e tradução para a fusão <i>BRAF-TMEM178B</i> ...	93
APÊNDICE C - Sequências do mRNA; CDS e tradução para a fusão <i>KDM7A-BRAF</i> .....	97
ANEXO A - Aprovação do comitê de ética .....	104

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) define câncer como “o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos” (INCA, 2022). Essa definição, embora minimamente satisfatória para o propósito de comunicar o conceito a um público leigo, simplifica uma condição que, sob análise mais detalhada, revela-se extremamente complexa e multifacetada.

Douglas Hanahan e Robert Weinberg, ao longo de suas carreiras, elucidaram as múltiplas características compartilhadas pelas neoplasias malignas em três publicações fundamentais, lançadas em 2000, 2011 e 2022. Além do crescimento desordenado e da capacidade de invasão, os autores destacaram diversas outras marcas, que caracterizam o câncer, como a sustentação da proliferação celular crônica, a evasão dos mecanismos de supressão do crescimento, a resistência à morte celular programada, o potencial replicativo ilimitado, a indução da angiogênese, a infiltração em tecidos adjacentes e a formação de metástases, além da reprogramação do metabolismo celular e da evasão da destruição imunológica (Fig.1).

Em suas atualizações mais recentes, Hanahan e Weinberg (2011 e 2022) incluíram conceitos adicionais, que ampliam a compreensão da biologia tumoral, como a instabilidade genômica, a ativação do sistema imune inato, a plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética, a influência de microbiomas polimórficos e a presença de células senescentes. Essas marcas refletem a complexidade do câncer, que vai além do simples crescimento celular desordenado (Fig.1).

Figura 1. Características compartilhadas entre os diversos tipos de câncer



Múltiplas marcas compartilhadas pelas neoplasias malignas

FONTE: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2022.

Tais características compartilhadas devem-se a um fator em comum: as alterações genéticas. O câncer surge a partir de um acúmulo de mutações, que não são devidamente reparadas pela maquinaria de reparo do DNA. Essas mutações podem incluir, entre outros, as alterações pontuais, alterações no número de cópias e rearranjos cromossômicos.

Sob essa perspectiva, as mutações podem ser classificadas como passageiras, quando não resultam em alterações vantajosas do ponto de vista da carcinogênese, ou como condutoras, quando promovem ou contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer. As mutações condutoras afetam genes envolvidos em vias, que influenciam direta ou indiretamente a proliferação ou a morte celular, principalmente oncogenes e supressores tumorais. Os proto-oncogenes são genes que, em sua atividade normal, participam da regulação da proliferação celular. Quando sofrem mutações, podem se transformar em oncogenes, promovendo a proliferação celular exacerbada. Por outro lado, os genes supressores tumorais têm a função de limitar a proliferação celular; quando mutados, podem ser inativados, o que contribui para o crescimento descontrolado das células (MCINNES, 2016).

Além disso, em muitos casos o câncer se comporta como uma doença multifatorial, influenciada não apenas por fatores genéticos, mas também por fatores ambientais, que contribuem para sua incidência e desenvolvimento, aumentando o risco de mutações. Exemplos incluem a exposição excessiva à luz ultravioleta, o consumo de álcool, o tabagismo e a obesidade (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Em contrapartida, a prática regular de atividade física e

uma alimentação balanceada e saudável, podem ser modulados para reduzir os riscos, por meio da regulação epigenética (FRIEDENREICH; RYDER-BURBIDGE; MCNEIL, 2021).

Com o aumento da população, da expectativa de vida e a ausência de melhorias significativas nos hábitos de vida, projeta-se um crescimento no número de casos de câncer, destacando sua relevância no contexto da saúde global. No Brasil, de acordo com Santos e colaboradores (2023), estima-se a ocorrência de 704 mil novos casos de câncer no período de 2023 a 2025, evidenciando a importância da doença e a necessidade de estudos, que abranjam sua complexidade.

## 1.2 Câncer de ovário

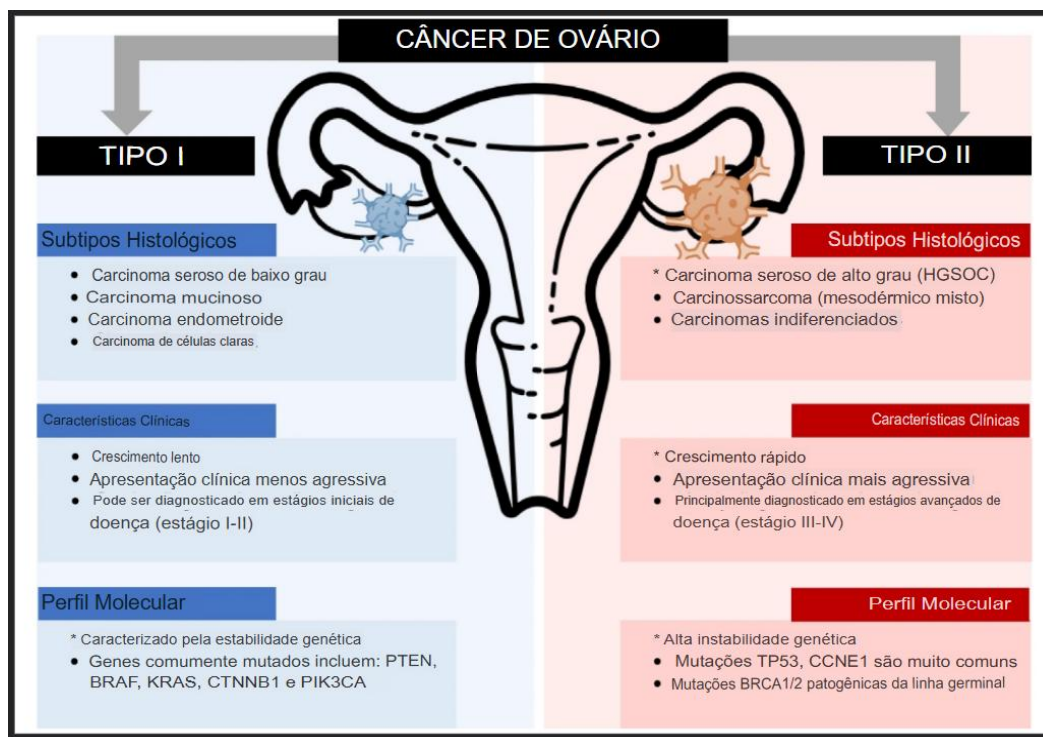
O câncer de ovário é a oitava neoplasia mais comum entre as mulheres. Em 2022, cerca de 300.000 novos casos foram diagnosticados e houve aproximadamente 200.000 óbitos por consequência da doença no mundo, sendo a segunda maior causa de morte por tumores ginecológicos (Globocan, 2022). A alta taxa de mortalidade se deve principalmente ao diagnóstico tardio devido à falta de métodos de rastreio. Sem sintomas específicos, a progressão do câncer de ovário apresenta incômodos como distensão abdominal, constipação e pressão pélvica, comuns a outras condições (ORR; EDWARDS, 2018). Os principais métodos de rastreio incluem ultrassonografia, tomografia computadorizada pélvica e detecção do marcador tumoral CA125 (GOFF et al., 2011)

O câncer de ovário pode ser classificado com base na célula de origem. Os tipos não epiteliais representam cerca de 5% dos casos e incluem: câncer de células germinativas, que se origina nas células responsáveis pela produção dos óvulos; câncer do estroma do cordão sexual, derivado de diferentes células do tecido conjuntivo, como as células da granulosa, Sertoli e/ou Leydig; carcinoma de pequenas células; e sarcoma de ovário, que tem origem em células mesenquimais (TORRE et al., 2018).

Já o câncer epitelial de ovário (CEO) é o tipo mais frequente, correspondendo a 95% dos casos. Devido à sua heterogeneidade histológica, molecular e microambiental, o CEO é subdividido em cinco grupos principais: seroso de alto grau (HGSOC, do inglês High-Grade Serous Ovarian Cancer), seroso de baixo grau (LGSOC, do inglês Low-Grade Serous Ovarian Cancer), câncer de células claras (OCCC, do inglês Ovarian Clear Cell Carcinoma), câncer endometriode e câncer de ovário mucinoso (LHEUREUX et al., 2019).

Kurman e Shi (2016), propuseram um modelo dualístico de divisão dos subtipos de CEO (Fig. 2). O grupo de tumores do tipo I engloba aqueles que se desenvolvem a partir de lesões extra-ovarianas benignas e, após a implantação no ovário, sofrem transformação maligna como LGSOC, endometrióides, OCCC, mucinosos, tumores mistos de Müller e tumores malignos de Brenner. Já o grupo II engloba as neoplasias malignas derivadas de lesões das células intraepiteliais na Trompa de Falópio que podem se disseminar como carcinomas envolvendo o ovário e sítios extra-ovarianos. Fazem parte deste grupo HGSOC, carcinosarcoma e carcinoma indiferenciado. O HGSOC ainda é subdividido em dois grupos de acordo com suas características histológicas e em quatro grupos de acordo com sua expressão gênica. Com relação às características moleculares, os tumores tipo I geralmente são tumores indolentes, de baixo grau, progressão lenta e se apresentam frequentemente em baixo estágio. Apresentam mutações somáticas nas vias de remodelação da cromatina e sinalização celular KRAS, BRAF, MEK, PI3K, AKT, entre outros. Por outro lado, cerca de 80% dos tumores do tipo II apresentam grande instabilidade genômica; isso deve-se a mutações nas vias relacionadas ao TP53 e outros genes da via de reparo por recombinação homóloga. Em contraste com o tipo I, apresentam-se normalmente em estadiamento avançado, sendo os tumores de alto grau extremamente agressivos (KURMAN; SHI, 2016).

Figura 2. Modelo dualístico de Kurman e Shi para CEO



Características clínicas e moleculares dos CEO de acordo com o modelo dualístico de Kurman e Shi.

Fonte: Adaptada de ZHU *et al.*, 2022.

Nos estágios iniciais, o tratamento inclui a histerectomia com salpingo-ooforectomia, podendo ser administrada a quimioterapia adjuvante. Para estágios mais avançados, é realizada a cirurgia de citorredução com retirada de órgãos reprodutivos e omento, e com administração de uma combinação de medicamentos quimioterápicos como carboplatina e paclitaxel (LHEUREUX *et al.*, 2019). Em pacientes com quadro clínico desfavorável ou doença extensa, pode-se optar pela neoadjuvância. Contudo, nem todos os tumores são sensíveis à platina. LGSOCs geralmente mostram resistência já nos primeiros ciclos de tratamento, enquanto HGSOCs são inicialmente sensíveis à platina, mas recidivam na maioria das vezes tornando-se resistentes. Nesses casos, o uso da terapia direcionada pode ser de grande eficácia.

Medicamentos como bevacizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que age impedindo angiogênese, e o uso de Inibidores de Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que prejudicam o reparo de quebras de fita simples de DNA, podem beneficiar e prolongar a sobrevida do paciente. Os medicamentos são ainda mais eficazes em tumores com características moleculares específicas. Bevacizumabe, por exemplo, é indicado para pacientes com tumores mais avançados (juntamente com a quimioterapia), para tumores resistentes à platina, ou para os que superexpressam VEGF.

Enquanto os inibidores de PARP são indicados para tumores com mutações em genes da via de recombinação homóloga, como *BRCA1* e *BRCA2*. Isso porque, o medicamento inibe a ação das enzimas PARP, necessárias para o reparo de quebras de fita simples de DNA durante o reparo por excisão de base. Quando não reparadas, as quebras de fita simples podem gerar quebras de fita dupla que, em condições normais, são corrigidas pela via de reparo por recombinação homóloga. Contudo, em tumores com mutações em *BRCA1* e/ou *BRCA2*, essa via também é ineficiente, gerando acúmulo de danos e subsequente morte celular (LHEUREUX et al., 2019; FARMER et al., 2005).

A partir dessa premissa, torna-se evidente a importância de tratamentos personalizados, que considerem as características histológicas e moleculares específicas do câncer de ovário. Além da busca por mutações, tem-se investigado, de forma mais recente, os impactos carcinogênicos, dentre outros aspectos moleculares, causados por fusões gênicas (MERTENS, 2015).

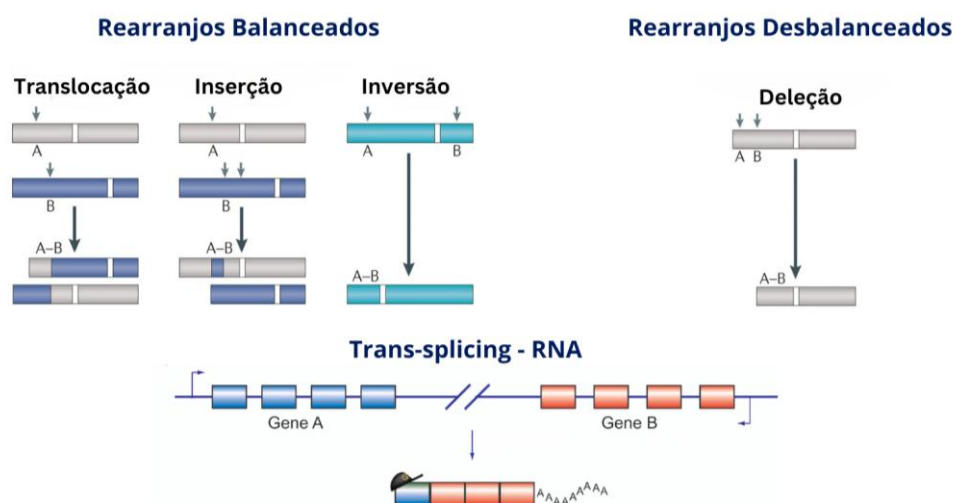
### 1.3 Fusões gênicas

O cromossomo Filadélfia, resultado de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22, foi uma das primeiras translocações genéticas amplamente estudadas. O gene híbrido, *BCR-ABL1*, é gerado a partir da fusão na região 5' do gene *BCR-1* (*Breakpoint Cluster Region-1*) e do proto oncogene *ABL* que codifica a fosfoproteína P210BCR-ABL com atividade de tirosina quinase implicada na patogênese da leucemia mielóide crônica (LMC), estando presente em 95% dos casos (FERNANDEZ, 2000). O gene quimérico possui uma função tirosina quinase constantemente ativada, promovendo a autonomia do fator de crescimento tumoral e inibindo a apoptose (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009). Pacientes portadores dessa translocação que realizam tratamento com imatinibe, um inibidor de tirosina quinase específico para essa alteração, podem ter sua sobrevida aumentada em quase duas vezes (EARP, 2017). Esse exemplo evidencia a importância de estudos voltados à detecção e análise do impacto desses eventos, bem como à identificação de suas potenciais aplicações como alvos terapêuticos, biomarcadores e fatores prognósticos.

Os eventos de fusões gênicas podem ocorrer a partir de rearranjos cromossômicos balanceados, quando não há perda ou ganho de material genético, ou não balanceados (Fig. 3). Mecanismos de fusão balanceados incluem translocações recíprocas, inserções e inversões, enquanto os não balanceados podem ocorrer por meio de deleção de segmentos intersticiais (MERTENS et al., 2015). Além disso, os eventos de fusão também podem acontecer em nível de RNA, a partir de

trans-splicing, uma forma de splicing alternativo que une éxons de pré-mRNAs distintos (HORIUCHI; AIGAKI, 2006). Em nível de DNA, as fusões podem ocorrer em regiões intrônicas ou nos limites de éxons, gerando transcritos com éxons intactos e o ponto de fusão nas bordas dos éxons, ou em regiões exônicas, o que, nesse caso, acarreta a interrupção do éxon.

Figura 3. Mecanismos geradores de fusões gênicas



Mecanismos de fusões gênicas incluem translocações, inserções, inversões, deleções e *trans-splicing*.

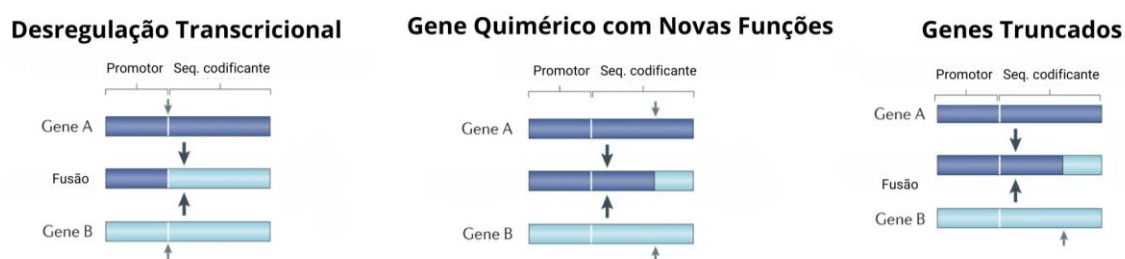
Fonte: Adaptada de MERTENS, et al., 2015.

Sabe-se que fatores ambientais podem estimular eventos de fusões gênicas. Um estudo realizado por Efanov e colaboradores (2018) correlacionou 65 casos de câncer papilífero de tireoide positivos para iodo radioativo (I-131) com a geração de fusões gênicas carcinogênicas. Mutações condutoras foram identificadas em 96,9% dos casos, sendo 26,2% decorrentes de mutações pontuais e 70,8% de fusões gênicas. Lu e colaboradores destacaram ainda a associação entre a exposição a diferentes agentes ambientais e a ocorrência de fusões gênicas envolvendo genes específicos. A radiação nuclear foi associada a fusões com o gene *RET*. A radiação ionizante, o tabaco e o carvão estavam relacionados a fusões envolvendo os genes *RET* e *ALK*. Os inseticidas, como permetrina e malatião, foram associados às fusões *ETV6-RUNX1*, *IGH-BCL2* e *KMT2A-AFF1*. Já a exposição solar prolongada esteve relacionada à fusão *EGFR-PDARGC1A*.

As fusões gênicas podem ter diversas consequências funcionais (Fig. 4), como a interrupção ou inserção de sequências reguladoras antes de uma sequência codificadora (NEEL et al., 1981), a criação de genes quiméricos com novas funções, como observado no gene *BCR-ABL1*, e

truncamento gênico. Por fim, algumas fusões podem ser simplesmente consequência da instabilidade genômica, sem oferecer vantagens ou desvantagens ao tumor (MERTENS et al., 2015). Essas consequências funcionais agem como mecanismos carcinogênicos ao interromper domínios ativos, impedindo a formação de complexos, alterar a localização subcelular de moléculas, inativar supressores tumorais e favorecer o desenvolvimento de tumores. Além disso, podem gerar desregulação transcricional positiva ou negativa, impedir a regulação por microRNAs (miRNAs) ou promover a regulação positiva de efetores a jusante (LU et al., 2021).

Figura 4. Consequências geradas por fusões gênicas



#### Eventos secundários



Fusões gênicas podem causar consequências funcionais como a interrupção ou inserção de sequências reguladoras, a criação de genes quiméricos e truncamentos de genes.

Fonte: Adaptada de MERTENS, et al., 2015

No contexto do câncer de ovário, as pesquisas sobre fusões gênicas são ainda mais recentes e têm se concentrado principalmente no HGSOC. Em uma análise de 400 amostras de HGSOC, o projeto TCGA, do inglês *The Cancer Genome Atlas*, identificou que as fusões detectadas estavam, na maioria das vezes, localizadas em regiões com variação no número de cópias (CNVs). Apenas três fusões recorrentes foram encontradas nesse estudo, o que sugere que essas alterações estão associadas a eventos secundários resultantes da instabilidade genômica característica do HGSOC (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011).

Por outro lado, Chen e colaboradores (2017), ao conduzirem um estudo funcional da fusão *MAN2A1-FER*, detectada em pacientes com câncer de ovário e outros tipos de câncer, observaram que essa fusão é capaz de aumentar a proliferação e a invasão de linhagens celulares cancerígenas, além de demonstrar atividade oncogênica em camundongos. Ademais, outras fusões gênicas, como *PCMTD1-CCNL2*, *ANXA5-CCNA2* e *CCN4-NRG4*, entre outras, têm

mostrado potenciais mecanismos envolvidos na carcinogênese ovariana, além de influenciar nas respostas a tratamentos. (LU et al., 2021).

Atualmente, o sequenciamento de nova geração (NGS) é considerado o método mais sensível para a detecção de fusões gênicas, permitindo a análise dessas alterações tanto em nível de DNA, por meio do sequenciamento abrangente do genoma completo (WGS), quanto em nível de RNA, por meio do sequenciamento do transcriptoma (WTS). Enquanto o WGS possibilita a identificação precisa do ponto de quebra das fusões, ele não garante que essas fusões estejam sendo transcritas. Além disso, fusões que ocorrem em regiões intrônicas longas podem apresentar maior dificuldade de detecção por essa abordagem. Por outro lado, o WTS permite a identificação de transcritos, possibilitando a análise de diferentes isoformas e da frequência de expressão dos transcritos (BRUNO; FONTANINI, 2020).

Apesar da alta sensibilidade do NGS, as técnicas convencionais de detecção, como a hibridização fluorescente in situ (FISH), a imuno-histoquímica (IHC) e a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), continuam sendo amplamente utilizadas para validação e análises específicas. O FISH é particularmente sensível para a identificação de translocações estruturais; a IHC permite a detecção da expressão proteica; e a RT-PCR, embora dependa de RNA de boa qualidade e de conhecimento prévio das sequências-alvo, é altamente específica e permite a quantificação da expressão (TACHON et al., 2019).

Essas técnicas, em conjunto com diversas ferramentas e programas de bioinformática disponíveis, oferecem suporte significativo para os estudos de fusões gênicas, que desempenham um papel crucial na compreensão de mecanismos moleculares e na identificação de potenciais alvos terapêuticos.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo Geral

Detectar e caracterizar fusões gênicas em amostras de pacientes com CEO, buscando compreender os impactos funcionais relacionados à carcinogênese ovariana e aos aspectos clínico-patológicos dos pacientes.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

1. Identificar, a partir de NGS do RNA de tumores CEO, transcritos provenientes de fusões gênicas;

2. Caracterizar as fusões gênicas identificadas, a partir de revisão da literatura e pesquisas em bases de dados públicos;
3. Caracterizar as fusões gênicas identificadas em termos de impactos funcionais previstos no nível do mRNA, degradação mediada por códon de parada prematuro e mudança de fase de leitura;
4. Caracterizar as proteínas de fusão, em termos de sequência, conservação evolutiva, efeito sobre domínios, motivos e outras regiões/elementos conservados;
5. Avaliar o impacto das fusões na estrutura 3D das proteínas quiméricas;
6. Avaliar o impacto das fusões nas modificações pós-síntese e na formação de complexos funcionais.
7. Relacionar as fusões gênicas identificadas com critérios clínicos das pacientes, tais como: características histopatológicas dos tumores, fatores prognósticos e resposta ao tratamento.

### 1.5. Justificativa e relevância

Apesar de sua baixa incidência entre os tumores ginecológicos, o CEO é uma neoplasia de importância global, sendo o tumor ginecológico de maior letalidade. A grande heterogeneidade molecular intra e inter tumoral presente nos subtipos da doença pode justificar seu desfecho insidioso. Estudos de painéis mutacionais têm sido avaliados nos últimos anos a fim de elucidar os mecanismos moleculares causais. Contudo, apesar da relevância das fusões gênicas na carcinogênese ao impactarem a expressão gênica, promoverem a ativação constitutiva de quinases e a inativação de genes supressores tumorais, as pesquisas nesse campo permanecem escassas. Nesse contexto, este estudo justifica-se pela necessidade de compreender as características moleculares envolvidas nos processos neoplásicos, com foco específico em fusões gênicas no CEO. A proposta visa contribuir para o avanço do conhecimento sobre possíveis biomarcadores relacionados à avaliação do prognóstico das pacientes, à resposta ao tratamento quimioterápico à base de platina e à identificação de novos alvos terapêuticos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Desenho experimental

Os dados analisados neste estudo foram originalmente gerados no âmbito do projeto

"Desenvolvimento de Painéis de Biomarcadores como Instrumentos Preditivos de Prognóstico e Resposta Clínica ao Tratamento do Câncer do Colo Uterino, Ovário e Mama: Estratégia para uma Oncologia Personalizada". No entanto, análises envolvendo fusões gênicas não haviam sido conduzidas, uma vez que não eram o foco inicial do estudo. As amostras encontram-se armazenadas no Biobanco de Tumores do Instituto Mário Penna.

Trata-se de um estudo tipo coorte, retrospectivo, observacional.

Foram avaliadas 24 pacientes com diagnóstico de CEO confirmado por laudo histopatológico no pós-operatório, atendidas no Hospital Luxemburgo – Instituto Mário Penna (IMP) em Belo Horizonte - MG, no período de 2015 a 2019.

Foram incluídos pacientes que atenderem aos seguintes critérios de inclusão:

- Indivíduos com idade igual ou superior a 18 (dezoito) anos e inferior a 85 anos;
- Indivíduos que apresentaram capacidade de compreender e consentir com sua participação neste estudo e que livremente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Indivíduos que apresentaram bom estado geral, ou seja, classificados com o estado de performance (PS, do inglês *performance status*)  $\leq 2$  dentro da escala de desempenho (ECOG do inglês Eastern Cooperative Oncology Group);
- Pacientes que não haviam passado por terapias sistêmica anteriormente.

Pacientes que não atenderam a algum dos critérios, foram excluídos do estudo.

## 2.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Mário Penna (CEP-IMP), conforme Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) nº 82703418.8.0000.5121. Todos os pacientes incluídos no estudo aceitaram participar mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e receberam identificação numérica anonimizada para preservar a confidencialidade.

## 2.3 Construção de bibliotecas de cDNA e Sequenciamento

Este estudo teve início a partir da análise bioinformática de dados previamente gerados por

NGS de bibliotecas construídas com o painel QIAseq Pan-Cancer Multimodal - QIAGEN ([QIAseq Multimodal Panel Handbook - QIAGEN](#)). As bibliotecas foram obtidas a partir da extração de DNA e RNA de amostras de tecido tumoral fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE, do inglês *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*), que se encontram armazenadas no Biobanco de tumores do Instituto Mário Penna.

### 2.3.1 Detecção de fusões gênicas

Para a detecção das fusões gênicas utilizou-se o programa computacional *QIAGEN CLC Genomics Workbench 23* com o fluxo de trabalho *Perform QIAseq Multimodal Analysis with TMB and MSI Illumina* da extensão *Biomedical Genomics Analysis*. Os parâmetros padrão do fluxo de trabalho sugeridos pelo fabricante do painel foram mantidos para as análises de mRNA. Como referência, foram utilizados os dados oriundos do genoma de referência da espécie *Homo sapiens*, versão GRCh38.p13, além de um banco de dados desenvolvido pela própria empresa com fusões conhecidas.

Apenas *reads* com PHRED>30 (0,1% de probabilidade de erro) foram consideradas. Após o mapeamento das *reads* no genoma de referência, o programa realizou a detecção de genes de fusão em um processo de duas etapas. Na primeira etapa ocorreu a identificação de potenciais fusões gênicas, enquanto na segunda etapa foi realizado o refinamento desses achados, acumulando evidências para cada fusão.

Nesta etapa, as *reads* de extremidades não alinhadas, ou seja, *reads* que não apresentaram correspondência significativa à referência, foram testadas como possíveis *reads* de fusão. São consideradas *reads* de fusão aquelas que possuem uma de suas extremidades desalinhada próxima a um limite de exon que pode ser remapeada próximo a outro limite de exon. As opções *detect exon skipplings e detect with novel exon boundaries* não foram ativadas, ou seja, o programa não foi configurado para detectar saltos de exon e, fusões que não ocorram em borda de exons conhecidos.

Os principais parâmetros considerados na etapa de detecção de fusão foram:

- Número mínimo de reads com extremidades não alinhadas: Quantidade mínima de reads que devem suportar uma fusão para que ela vá para a etapa de alinhamento, definido como 1;
- Comprimento mínimo da sequência não alinhada: Apenas extremidades com mais de

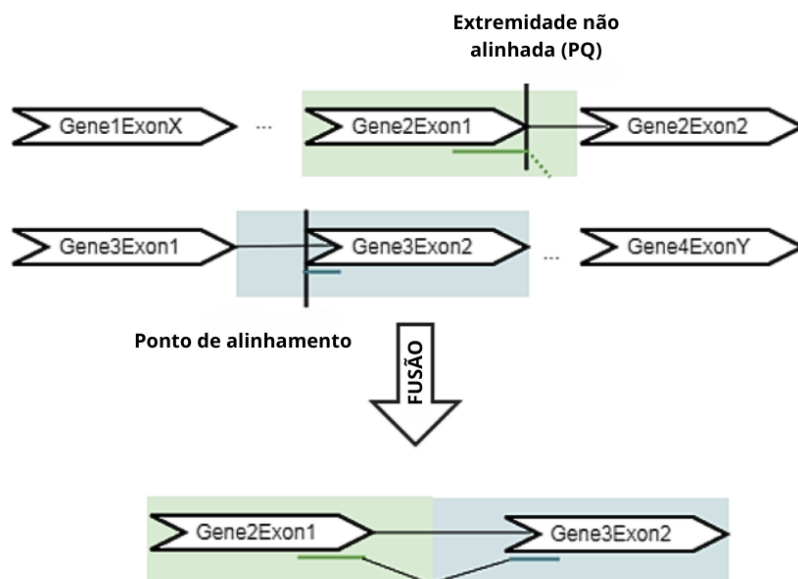
15 nucleotídeos foram consideradas;

- Distância máxima de um limite de exon conhecido: Apenas reads com extremidades que se alinham até 10pb de distância de limites conhecidos de exons foram consideradas;
- Taxa de erro assumida: Valor usado para calcular o *Z-score* e o *p-value*, utilizou-se o valor de 0,001.

### 2.3.2 Refinamento dos potenciais genes de fusão

Nessa etapa, as *reads* de extremidades não alinhadas são novamente mapeadas para um cromossomo artificial que contém a sequência do gene de fusão “assumida” a partir da sequência da read de extremidade não alinhada (Fig. 5). Além disso, o número de reads selvagens computadas pelo mapeamento original de RNA-Seq direcionado que mapeiam para o ponto de interrupção no gene selvagem também são contadas. Em seguida, a ferramenta calcula o *Z-score* e o *p-value* usando um teste binomial. O *p-value* máximo aceitável para a detecção de fusões é 0,005, o que garante um alto nível de significância estatística, e o *Z-score* mínimo é 2,5. O *p-value* mede a probabilidade da fusão ser reportada mesmo sendo falsa, logo, a fusão só será reportada se houver menos de 0,5% de chances dela ser falsa (valores abaixo de 1:10.000.000 são arredondados). O *Z-score* expressa o número de desvios padrão que um valor está distante da média esperada. Logo, um *Z-score* de 2,5 significa que o valor observado está 2,5 desvios padrão acima da média esperada, sugerindo que a fusão é muito diferente do que seria esperado para um ruído ou erro no experimento.

Figura 5. Cromossoma artificial



Cromossoma artificial montado a partir de uma *read* cujo alinhamento é interrompido em um determinado gene e, uma de suas extremidades, passa a se alinhar a outro gene, representando uma possível fusão gênica. Essa abordagem permite a validação e a visualização das leituras de suporte.

FONTE: Adaptado do Qiagen Bioinformatics Manual - CLC Genomics Workbench

Na etapa de refinamento os parâmetros que podem ser ajustados são:

- Número mínimo de *reads* de suporte: *reads* de suporte são as *crossing reads*, ou seja, *reads* que mapeiam para ambos os genes englobando o ponto de fusão. O valor utilizado foi 10;
- *p-value* máximo: Fusões que ultrapassem o valor máximo (0,005) não são reportadas;
- *Z-score* mínimo: Fusões que não atinjam o valor mínimo (2,5) não são reportadas.
- Distância do ponto de interrupção: O número mínimo de nucleotídeos que uma *read* deve cobrir em cada lado do ponto de interrupção para que seja contado como uma leitura de suporte à fusão. O valor foi definido como 10.

Na etapa de refinamento, também é possível alterar parâmetros ligados ao alinhamento das *reads* para o genoma de referência, intensificando ou afrouxando a análise de qualidade das *reads* envolvidas nas fusões.

Na etapa de alinhamento, o primeiro ponto foi definir uma pontuação de correspondência (*Match score*) para as *reads* em relação ao mapeamento contra a referência. Utilizou-se o valor padrão de 1 para cada nucleotídeo alinhado. Em seguida, definiu-se um custo de incompatibilidade (*Mismatch cost*), que é descontado a cada nucleotídeo ambíguo presente na sequência, o valor utilizado foi 4. Por fim, foi determinado o modelo de custo que é utilizado para contabilizar inserções e deleções, sendo eles, “*linear gap cost*” ou “*affine gap cost*”.

Utilizou-se o parâmetro “*affine gap cost*” para as análises. Nesse modo, a cada gap de inserção ou deleção é atribuído um custo de 6, e para cada base inserida ou deletada em relação à referência é descontado mais 1 ponto. No fim, apenas as *reads* que alinham ao menos 50% de sua sequência para a referência com uma similaridade mínima de 80% são consideradas, ou seja, o valor mínimo para fração de Comprimento (*length fraction*) é 0,5 e o de fração de similaridade (*similarity fraction*) é 0.8. O tamanho mínimo aceito das *reads* foi de 15 pb e o tamanho máximo foi de 1000pb.

#### 2.4 Caracterização *in silico* das fusões

Para verificar o ponto de alinhamento dos mRNAs e das sequências de DNA codificantes (CDS, do inglês *coding DNA sequence*) nos genes envolvidos utilizou-se os programas BLASTN e BLASTP (Altschul et al., 1990). A análise dos domínios funcionais foi realizada com base no banco de dados *Conserved Domain Database (CDD)* (WANG et al., 2023). O programa Clustal Omega (Madeira et al., 2022) foi utilizado para alinhamento de múltiplas sequências. As propriedades físico-químicas foram preditas utilizando-se a ferramenta ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) e a localização subcelular foi predita com o programa DeepLoc (THUMULURI et al., 2022). Finalmente, realizou-se a predição estrutural das proteínas no programa Robetta (KIMMELMAN et al., 2004), que utiliza o método de predição de novo. Demais informações sobre os genes e suas funções foram obtidas a partir de revisão na literatura.

#### 2.5 Docking *BRCA1-VATI*

Com o objetivo de comparar a estabilidade e afinidade das interações realizadas pelo *BRCA1* selvagem com as interações realizadas pela proteína quimérica, executou-se o docking molecular focando nos domínios BRCT em tandem do gene *BRCA1*, região alterada pela fusão. Optou-se por analisar as interações com ligantes que, de acordo com a literatura, formam

complexos relevantes com os domínios BRCT em tandem. Todas as análises computacionais foram conduzidas no software MOE - Molecular Operating Environment, ChemComp, versão 2024. Os dados foram gerados por Me. Carlos Araújo e analisados em conjunto.

As estruturas dos domínios BRCT em tandem selvagem com seus respectivos ligantes foram importadas do banco de dados Protein Data Bank – PDB/RCSB (<https://www.rcsb.org/>) para o programa MOE. Foram utilizadas as seguintes estruturas:

- Estrutura cristalizada de *BRCA1* BRCT ligado ao peptídeo Abraxas – ID 4JLU;
- Estrutura cristalizada de *BRCA1* BRCT ligado ao peptídeo BACH1 – ID 1T29;
- Estrutura cristalizada de *BRCA1* BRCT ligado ao fosfopeptídeo CtIP – ID 1Y98;
- Estrutura cristalizada de *BRCA1* BRCT ligado ao fosfopeptídeo acetil-CoA carboxilase 1 – ID 3COJ.

Após a importação das estruturas para o ambiente MOE, foi realizado o preparo das moléculas com a “Quick Prep”, uma ferramenta automatizada que ajusta a estrutura por meio da correção de átomos distantes, adição de átomos de hidrogênio ausentes, protonação, entre outros ajustes. Esse processo assegura que átomos não detectados pelo método de predição original sejam incluídos, garantindo maior precisão nas análises.

### 2.5.1 Alinhamento e predição da estrutura tridimensional por homologia

Todos os dados gerados na predição por homologia e docking molecular foram obtidos a partir de ferramentas do programa MOE. Por meio da ferramenta “Sequence Editor” foi inserida a sequência secundária da proteína de fusão. Utilizando a ferramenta “Align/Superpose”, as sequências do domínio BRCT obtidas no PDB e a sequência da proteína de fusão foram alinhadas. Após o alinhamento, realizou-se a predição da estrutura tridimensional pelo método de homologia a partir da ferramenta “Homology Model”. A sequência do ligante foi inserida para que ele fosse predito em conjunto com cada proteína. A estrutura tridimensional predita foi validada por meio do gráfico Phi/Psi de Ramachandran.

Em seguida, o parâmetro energia potencial (Potential Energy ) foi aplicado às estruturas para comparação dos resultados. A energia potencial reflete a energia total associada à conformação de uma molécula ou sistema molecular, incluindo interações de ligação, ângulos, torsionais, eletrostáticas, forças de Van der Waals, entre outras.

### 2.5.2 Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado para comparar a estabilidade e afinidade de ligação entre o domínio selvagem e o alterado, ambos com os mesmos ligantes. Logo, as análises conduzidas com a ferramenta “Dock”, incluíram tanto as estruturas importadas do PDB quanto a proteína de fusão predita. A referência para a posição do ligante com o receptor foi definida como a pose registrada nas estruturas cristalográficas disponíveis no banco de dados.

Para uma melhor visualização das interações e ligações entre receptor e ligante, foi utilizado o recurso “Ligand Interactions”, que gera um mapa representando os aminoácidos do receptor e suas interações com o ligante. A análise foi aplicada tanto à proteína selvagem quanto à quimérica predita para fins de comparações.

A validação dos resultados de *docking* foi feita através da avaliação do RMSD - *root-mean-square-deviation*, para todos os ligantes.

### 2.6 Validação das Fusões

A validação das fusões foi realizada a partir das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR hemi-nested e posterior sequenciamento Sanger, utilizando amostras de RNA extraído de blocos de parafina contendo tecido tumoral das pacientes. Para cada paciente, o RNA extraído foi convertido em cDNA e, após amplificação por PCR, o amplicon foi submetido ao sequenciamento.

#### 2.6.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit EZ2 AllPrep DNA/RNA FFPE ([EZ2 AllPrep DNA/RNA FFPE Kit Quick-Start Protocol - QIAGEN](#)) e também de forma manual com o Kit AllPrep DNA/RNA também da QIAGEN ([AllPrep 96 DNA/RNA Kit Quick-Start Protocol - QIAGEN](#)). A síntese de cDNA foi conduzida utilizando o Kit SuperScript™ IV VILO™ Master Mix - ThermoFisher ([SuperScript IV VILO Master Mix](#)).

#### 2.6.2 PCR Convencional

A PCR convencional foi realizada utilizando o Kit AllTaq Master Mix da Qiagen ([AllTaq](#)

Master Mix Kit - QIAGEN). Foram testados diferentes volumes de cDNA (25, 50 e 125 ng) e temperaturas de anelamento variando entre 56°C e 62°C. Como controle positivo, utilizou-se o conjunto de primers endógenos para o gene *HPRT1*. Para a visualização dos amplicons, foi empregada a eletroforese em gel de agarose a 2%.

Os primers utilizados foram projetados utilizando o programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012), conforme as configurações padrão. Foram desenvolvidos três conjuntos de primers por fusão (Tab.1), cada um visava a amplificação de um fragmento de aproximadamente 300pb, que abrangesse uma porção do gene da extremidade 5' e uma porção do gene da extremidade 3', envolvidos na fusão. A escolha de projetar um maior número de primers foi motivada pela alta degradação do RNA extraído de tecido FFPE, o que pode comprometer a eficiência da amplificação.

**Tabela 1.** Desenho dos primers para as fusões reportadas

Identificação		Sequência
BRCA1[1] -VAT1 (1)	F	ATCAACTGGAATGGATGGTACAGCTGTG
	R	AAGAGGACCATGTAGGCTGTAATGTAATT
BRCA1-VAT1 (2)	F	CTGTTGCTATGGGCCCTTCA
	R	AAGGCAGCAGCTTCCTCAA
BRCA1-VAT1 (3)	F	CAACATGCCCACAGATCAACT
	R	GCAAGGCAGCAGCTTCCT
KDM7A-BRAF (1)	F	TACGACGTGAACCGCTTCAT
	R	TCAGTTCCGTTCCCCAGAGA
KDM7A-BRAF (2)	F	CGTGAACCGCTTCATGATCG
	R	TCCGTTCCCCAGAGATTCCA
KDM7A-BRAF (3)	F	TACTGTGTGTGCCGGCAG
	R	TGCATCTAGCTTGCTGGTGT
BRAF-TMEM178B (1)	F	GCTCTGTTCAACGGGGACA
	R	GAGGTTCCCTGGGGATGGTTG
BRAF-TMEM178B (2)	F	CAGGCTCTGTTCAACGGGG
	R	GTGTAGGGCATGCCACTCAT
BRAF-TMEM178B (3)	F	GGCCAGGCTCTGTTCAAC
	R	AAAGAGGATGATGGCCACCG

### 2.6.3 PCR Hemi-nested

Na tentativa de aumentar a sensibilidade da detecção optou-se por realizar a PCR hemi-nested, técnica que realiza duas amplificações em sequência. Na primeira amplificação é utilizado um par de primers externos para gerar um amplicon mais longo, já na segunda, um dos primers externos é combinado com um primer interno, aumentando a detecção do alvo. A PCR hemi-nested foi realizada utilizando o Kit AllTaq Master Mix da QIAGEN (AllTaq Master Mix Kit - QIAGEN). Os primers para essa técnica foram projetados com o auxílio do programa Primer3Plus (Tabela 2), consistindo de um primer forward (FW) e dois primers reverse (RV1 e RV2). Essa configuração possibilitou a amplificação de dois fragmentos: um maior, com 114 pb, e um menor com 83 pb, estando o fragmento menor contido no maior.

**Tabela 2.** Primers para a PCR *hemi-nested*

<b>Identificação</b>	<b>Sequência</b>
BRCA1_VAT1_FW	GTCCACCCAATTGTGGTTGTGC
BRCA1_VAT1_RV1	CAACACCATCACCCGGTCTC
BRCA1_VAT1_RV2	GTCACCTCTTCCTGCCACAT

Os primers foram inicialmente testados em uma PCR convencional, utilizando amostras da biblioteca de sequenciamento, nas quais a fusão já havia sido previamente detectada. Para essa reação, foi utilizada uma concentração de cDNA de 14,6 ng/μl, com volume final de 20 μl e temperatura de anelamento de 60°C. Não foram utilizados primers endógenos, já que a etapa de fragmentação não permitiria sua amplificação. Os resultados foram visualizados por eletroforese capilar no sistema QIAxcel ((EN) - QIAxcel DNA Handbook - QIAGEN).

Após essa fase, foi realizada a PCR hemi-nested com a amostra de RNA extraída do tecido tumoral. Na primeira etapa da PCR hemi-nested, o par de primers foi utilizado para amplificar o fragmento longo. Na segunda etapa, foi realizada uma amplificação utilizando os primers para gerar o amplicon curto. A visualização final dos resultados foi feita por eletroforese capilar no QIAxcel. A temperatura de anelamento utilizada foi de 60°C.

#### 2.6.4 Purificação do produto da *hemi-nested* PCR para sequenciamento Sanger

Após a realização da *hemi-nested* PCR, o produto da amplificação foi purificado seguindo uma série de etapas. Primeiramente, o produto da PCR foi transferido para um tubo de 0,5 mL, e um volume equivalente de polietilenoglicol (20%) à temperatura ambiente foi adicionado, seguido de homogeneização. Em seguida, a solução foi vortexada por 15 segundos e mantida em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após esse período, realizou-se a centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm, em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi lavado com 125 µL de etanol (80%) gelado e centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, etapa que foi repetida. Posteriormente, o álcool foi removido com pipeta e deixado evaporar por 10 minutos. O pellet foi então ressuscitado em 25 µL de água mili-Q e incubado em banho-maria overnight a 37°C para facilitar a ressuspensão. Por fim, a amostra foi quantificada no NanoDrop.

O produto purificado foi enviado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA Sanger da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte. O amplicon foi ressuscitado e enviado com concentração de 1,94 ng/µL, estando na faixa recomendada pela empresa (1-3ng/µL), enquanto os primers foram enviados a uma concentração de 5 pmol/µL.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscou-se identificar fusões gênicas em amostras de tecido tumoral FFPE de pacientes diagnosticadas com CEO. A análise foi realizada a partir de dados de RNA-seq direcionado, seguidos de processamento e análise dos dados no programa CLC Genomics Workbench, com o objetivo de compreender os possíveis impactos dessas fusões na carcinogênese ovariana.

#### 3.1 Caracterização *in silico* das fusões

Foram identificadas cinco fusões gênicas em cinco nas 24 pacientes analisadas (21%): *BRCA1-VAT1*, *BRAF-TMEM178B*, *KDM7A-BRAF*, *NOTCH2NLB-NOTCH2* e *NOTCH2-NOTCH2NLB*. As fusões *BRAF-TMEM178B* (*p-value* 0,00; *Z-score* 183,77), *BRCA1-VAT1* (*p-value* 0,00; *Z-score* 12,26), e *NOTCH2-NOTCH2NLB* (*p-value* 0,00; *Z-score* 54,72) foram identificadas na paciente PCO65, diagnosticada com LGSOC, a fusão *KDM7A-BRAF* (*p-value* 0,00; *Z-score* 4,16) estava presente na paciente PCO37 diagnosticada com HGSOC, duas outras

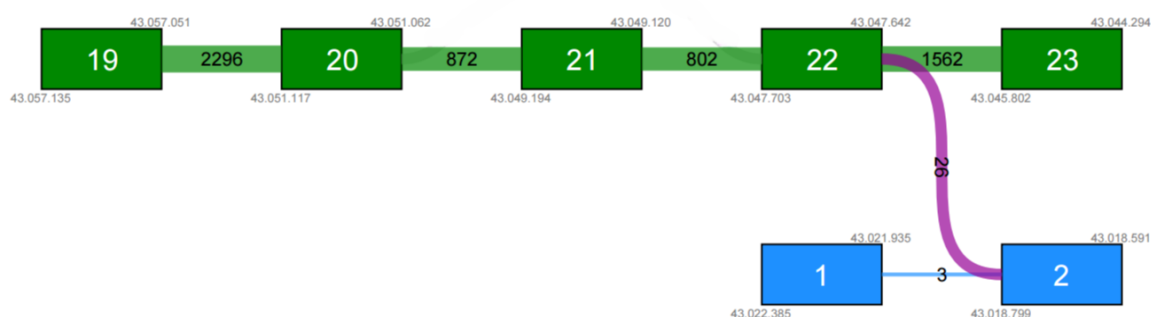
pacientes (PCO52 e PCO53, também possuíam HGSOE) apresentaram a fusão *NOTCH2-NOTCH2NLB* (*P-value* 0,00; *Z-score* 21,12 e *p-value* 0,00; *Z-score* 16,96), assim como a paciente PCO83, reportada com a fusão *NOTCH2NLB-NOTCH2* (*P-value* 0,00; *Z-score* 8,87).

Contudo, por se tratarem de genes homólogos e conforme a recomendação do programa de análise, optou-se por desconsiderar as fusões envolvendo os genes *NOTCH2* e *NOTCH2NLB* devido à alta probabilidade de serem resultados falso-positivos. Das três fusões restantes, apenas a *KDM7A-BRAF* é mencionada na literatura. Entretanto, o transcrito em questão difere do encontrado neste trabalho (ROSS et al., 2016). As fusões *KDM7A-BRAF* e *BRAF-TMEM178B* geram transcritos com *stop codons* prematuros, acarretando a perda de todos os domínios funcionais das proteínas. Já, a fusão *BRCA1-VAT1* preserva a maior parte dos domínios do gene *BRCA1*, apresentando alteração apenas no último domínio funcional, resultante da mudança na matriz de leitura, que ocorre após o ponto de fusão. As sequências das fusões estão disponíveis no material suplementar.

### 3.1.1 Fusão *BRCA1-VAT1*

A fusão *BRCA1-VAT1*, detectada em uma paciente com LGSOE (PCO65), envolve o gene *BRCA1* na extremidade 5' e o gene *VAT1* na extremidade 3' (Fig 6). Ambos os genes mapeiam em 17q21.3, *VAT1* cerca de 40 kb distal a *BRCA1*. Os transcritos de referência fornecidos pelo programa foram: *BRCA1* (NM\_007294.3), nucleotídeo 1 ao 5699, e *VAT1* (NM\_006373.4), nucleotídeo 451 ao 2699. A fusão é apoiada por 26 *reads* de suporte. Para o fragmento selvagem foram detectadas 1652 *reads*. Pode-se inferir que a frequência da fusão é de 1:63 ou aproximadamente 1,54%.

Figura 6. Fusão Gênica *BRCA1-VAT1*



Fusão gênica envolvendo os genes *BRCA1* na extremidade 5'(em verde) e o gene *VAT1* na extremidade 3' (em azul). O transcrito é suportado por 26 *reads* de suporte (linha roxa).

Para essa fusão, o CLC reportou uma CDS, que gera uma proteína de 1851 aminoácidos, sendo 1822 homólogos aos da proteína *BRCA1* isoforma 1 e os outros 29 derivados de *VATI*. No entanto, após o ponto de fusão há uma mudança na matriz de leitura, de modo que a sequência de aminoácidos presente na proteína quimérica não está presente no *VATI* selvagem. A análise de conservação do fragmento adicionado à proteína quimérica não identificou homologia, sugerindo que não corresponde a uma terminação funcional conhecida.

No banco de dados *Domains Conserved* (NCBI), verificou-se que a proteína recombinante retém os domínios RING-HC\_BRCA1 (aminoácidos 7-99), BRCT\_assoc ( aminoácidos 345-508) e BRCT\_BRCA1\_rpt1 (1650-1746), mas perde o domínio BRCT\_BRCA1\_rpt2 (aminoácidos 1758-1855) devido às substituições de aminoácidos após o resíduo 1822 (Fig. 7).

Figura 7. Domínios Conservados na proteína quimérica *BRCA1-VATI*



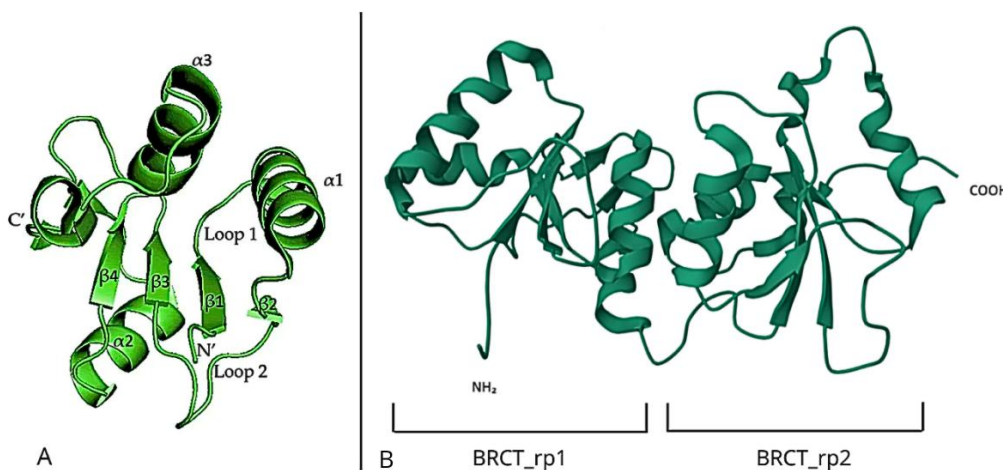
A proteína de fusão retém os domínios RING-HC\_BRCA1, BRCT\_assoc e BRCT\_rpt1. No entanto, o domínio BRCT\_rpt2 é interrompido no aminoácido 1822.

FONTE: Imagem elaborada pela autora usando dados do *domains conserved* (NCBI)

A maioria dos domínios BRCT estão presentes em proteínas envolvidas no reparo do DNA e na resposta ao ponto de verificação do ciclo celular. Além disso, o número de proteínas contendo este domínio por genoma está correlacionado com a complexidade do *pool* gênico (RODRIGUEZ et al. 2003; SHENG; ZHAO; HUANG, 2011). SHAKYA e colaboradores. (2011), após análises de mutações nos diferentes domínios de BRCA1, concluíram que a função de supressor tumoral do gene está ligada a interações dos domínios BRCT com fosfoproteínas. Os domínios BRCT em tandem, formados por dois módulos BRCT, estão localizados na região C-terminal da proteína BRCA1 nativa. Cada um deles contém aproximadamente 100 aminoácidos, que interagem formando uma estrutura globular (Fig. 8) com uma folha  $\beta$  paralela de quatro cadeias ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ ) cercada por duas  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 1$  e  $\alpha 3$ ) na extremidade C-terminal e uma  $\alpha$  hélice ( $\alpha 2$ ) na extremidade N-terminal (Fig. 8), resultando na seguinte estrutura geral:  $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$  (PEÑA-GUERRERO et al., 2023). A interação entre os

módulos ocorre a partir da  $\alpha 2$  do BRCT\_rpt1 e das  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  do BRCT\_rpt2 (SHENG; ZHAO; HUANG, 2011).

Figura 8. Estrutura tridimensional do domínio BRCT

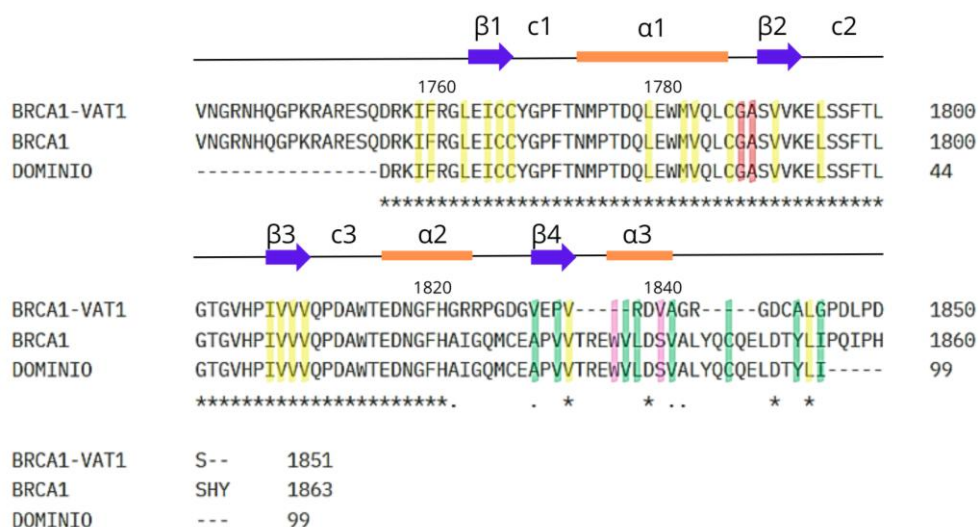


O domínio BRCT é composto por uma estrutura globular com estrutura geral  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\alpha 3$  (A). As repetições em tandem possuem um link de 22 aminoácidos e interagem a partir de  $\alpha 2$  da BRCT\_rpt1 e de  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  da BRCT\_rpt2 (B).

FONTE: Adaptado de ISMAIL et al., 2024 e PDB- 1Y98

Alinhamentos entre os domínios BRCT de diferentes proteínas e organismos revelam uma alta heterogeneidade dos resíduos que o formam, com uma identidade média de aproximadamente 14%. Contudo, a conservação de aminoácidos hidrofóbicos é observada em cinco regiões: N-terminal/ $\beta 1$ ,  $\alpha 1/\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4/\alpha 3$  e C-terminal (SHENG; ZHAO; HUANG, 2011). Os resíduos Trp1837, Val1838, Leu1839, Ser1841 e Val1842, que formam a hélice  $\alpha 3$  de BRCT\_rpt2, são frequentemente conservados; alguns deles situam-se na superfície da estrutura, enquanto outros interagem com  $\alpha 1$ . Os aminoácidos de  $\alpha 1$ , BRCT\_rpt1, que interagem com  $\alpha 3$  (Leu1780, Met1783 e Val1784) também são conservados, sugerindo um papel essencial dessa região para o funcionamento correto do domínio. Os resíduos Gly1788, Ala1789, Trp1837 e Ser1841 são os mais conservados da família BRCT (SHENG; ZHAO; HUANG, 2011). A fusão *BRCA1-VAT1* causou a perda de oito aminoácidos hidrofóbicos conservados (Ala1830, Val1832, Val1838, Leu1839, Val1842, Cis1847, Tir1853 e Ile1855) e de dois resíduos altamente conservados (Trp1837 e Ser1841) da proteína selvagem (Fig.9).

Figura 9. Alinhamento dos resíduos conservados BRCT\_rpt2\_BRCA1



A proteína de fusão acarretou a perda de 8 aminoácidos hidrofóbicos (destaque em verde) e de 2 resíduos altamente conservados (destaque em rosa). Os destaques em amarelos são os resíduos hidrofóbicos conservados que foram mantidos na proteína de fusão, enquanto o destaque em vermelho são os altamente conservados que foram mantidos.

FONTE: Imagem criada pela autora, utilizando os dados de ZHANG et al., 1998.

Os domínios BRCT em *tandem* são cruciais para interações fosfo-dependentes com várias enzimas e polipeptídeos, como a acetil-CoA carboxilase  $\alpha$  (ACCA), a helicase de DNA BACH1, a endonuclease CtIP e a proteína Abraxas (CHRISTOU e KYRIACOU, 2012). Os mecanismos moleculares responsáveis por essas interações foram elucidados a partir de pesquisas, que investigam a interação entre os domínios BRCT e a proteína fosforilada BACH1 (SHIOZAKI et al., 2004; CLAPPERTON et al., 2004; WILLIAMS et al., 2004). A primeira região de interação, localizada no BRCT\_rpt1, é seletiva para serina fosforilada (pSer) que interage diretamente com os resíduos Ser1655 e Lys1702 de *BRCA1*. A segunda região de interação é um bolso hidrofóbico na interface entre os domínios BRCT com interações de Phe nos resíduos Arg1699, Phe1704, Met1775 e Leu1839 (SHIOZAKI et al., 2004; CLAPPERTON et al., 2004; WILLIAMS et al., 2004). Conforme revisado por Leung e Glover (2011), essa mesma região é conservada nos domínios BRCT de proteínas e organismos distintos. Além disso, a revisão apresenta informações de estudos, que destacam a sequência de interação conservada pSer-X-X-Phe em BACH1, CtIP, ACCA e Abraxas.

Na linhagem celular humana derivada de osteossarcoma (U2OS), as mutações P1749R, G1738E, M1775R e Y1853X em *BRCA1* resultaram em perda completa da ligação ao

fosfopeptídeo BACH1 (CLAPPERTON et al., 2004). Na linhagem celular, HEK293, derivada de células renais embrionárias humanas, as mutações A1708E, P1749R e o truncamento em Y1853, também interrompem a interação com CtIP (Li et al., 1999). Ademais, Williams et al. (2003) demonstraram que domínios BRCT truncados nos resíduos 1853, 1829 e 1805 foram degradados por baixas concentrações de tripsina, enquanto BRCT de comprimento total (resíduos 1646-1863, no caso do trabalho deles) é altamente resistente à clivagem, indicando que alterações no domínio BRCT levam a uma diminuição na estabilidade proteolítica.

A partir do exposto, fica evidente a importância dos resíduos conservados nos domínios BRCT para a interação de *BRCA1* com diversas proteínas. Alterações nessas regiões podem comprometer a formação de complexos proteicos essenciais para sua função. Dessa forma, a fusão *BRCA1-VAT1*, que altera a sequência a partir do aminoácido 1823 do *BRCA1* selvagem, provavelmente interrompe interações críticas, afetando tanto resíduos diretamente envolvidos na ligação ao ligante, como Leu1839, quanto aqueles responsáveis pela conformação estrutural do domínio, incluindo Trp1837, Val1838, Ser1841 e Val1842, presentes na  $\alpha 3$  de BRCT\_rpt2. Essas modificações podem comprometer a estabilidade e a função da proteína, com potenciais repercussões em seus papéis celulares.

As propriedades físico-químicas comparadas entre a proteína BRCA1 e a proteína quimérica BRCA1-VAT1 revelam diferenças sutis em diversos parâmetros (Tab. 3).

**Tabela 3.** Propriedades físico-químicas BRCA1 X BRCA1-VAT1

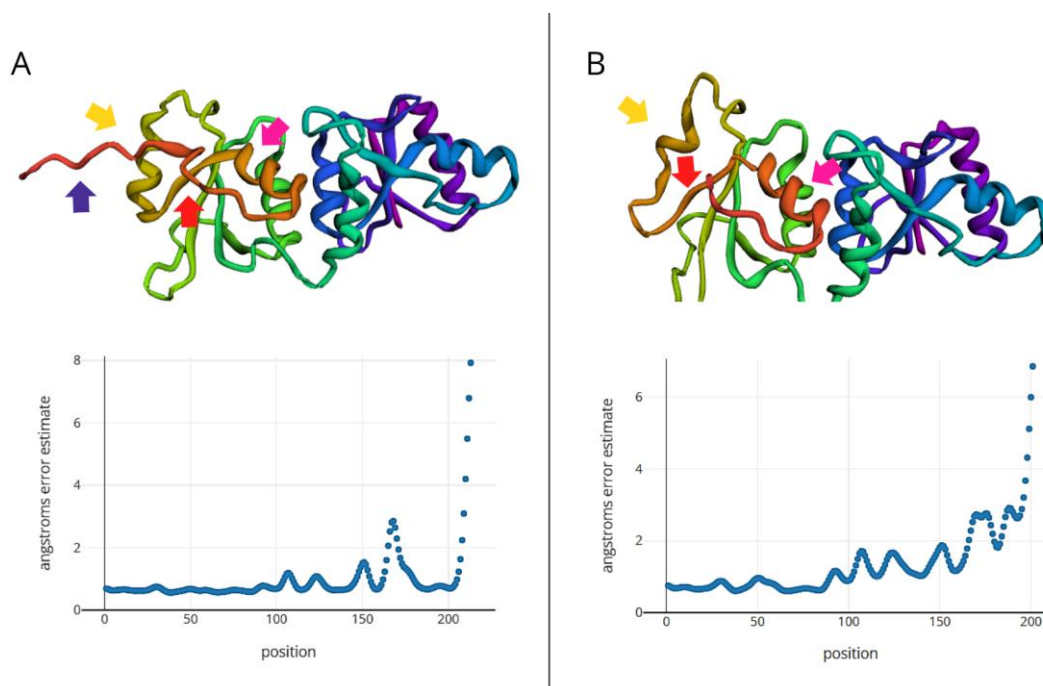
<b>Propriedades</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA1-VAT1</b>
<b>Número de Aminoácidos</b>	1863	1851
<b>Peso Molecular</b>	207720.85	205936.65
<b>pI Teórico</b>	5.29	5.30
<b>Resíduos com carga negativa (Asp + Glu)</b>	283	284
<b>Resíduos com carga positiva (Arg + Lys)</b>	213	216
<b>Fórmula Atômica</b>	C8908H14246N2554O3014S74	C8816H14120N2542O2994S72
<b>Número Total de Átomos</b>	28796	28544
<b>Coefficiente de Extinção (280 nm)</b>	103940	93845
<b>Abs 0,1% (cistinas)</b>	0.500	0.456
<b>Abs 0,1% (Cys reduzido)</b>	0.487	0.443
<b>Meia-Vida Estimada</b>		
Mamíferos ( <i>in vitro</i> )	30 horas	30 horas
Levedura ( <i>in vivo</i> )	20 horas	20 horas
<i>Escherichia coli</i> ( <i>in vivo</i> )	10 horas	10 horas
<b>Índice de Instabilidade</b>	54.68 (Instável)	55.22 (Instável)
<b>Índice Alifático</b>	69.01	68.19
<b>GRAVY (Média Geral de Hidropaticidade)</b>	-0.785	-0.803

À primeira vista, as similaridades descritas na Tabela 3 poderiam sugerir que a fusão não afete a função da proteína BRCA1. Estes dados devem ser interpretados com cautela, porque, em se tratando de uma proteína grande, cujo tamanho foi pouco afetado pela fusão, grandes efeitos biofísicos e bioquímicos não seriam esperados, a menos que a sequência após a fusão fosse muito atípica (por exemplo, muito ácida ou muito básica; um novo sinal de endereçamento; um novo domínio funcional etc.). Estas características biofísicas e bioquímicas refletem a composição de aminoácidos, mas não efeitos específicos da sequência na função, interações ou meia-vida da proteína.

De acordo com as análises no programa DeepLoc, a proteína BRCA1-VAT1 possui maior probabilidade de estar localizada no núcleo (0,8304), devido ao sinal de localização nuclear encontrado na região C-terminal da estrutura primária. Além disso, há uma probabilidade de 0,4365 de a proteína estar localizada no citoplasma, o que está de acordo com o estudo de Moreau, Karen et al. (2006), que relaciona a função citoplasmática do *BRCA1* com a regulação metabólica da síntese de lipídios no citoplasma, através de interações com ACCA.

Na estrutura tridimensional, predita utilizando-se o programa Robetta pelo método de predição *de novo*, pode-se notar diferenças na  $\alpha 2$  de BRCT\_rpt2, que na proteína de fusão apresenta-se deformada (Fig. 10). Além disso, enquanto na proteína selvagem a folha  $\beta 4$  ( BRCT\_rpt2) é formada por APVVT, na proteína de fusão é formada por GVEPVRD, se tornando um pouco mais alongada e hidrofílica. Surpreendentemente, uma estrutura similar a  $\alpha 3$  (BRCT\_rpt2) ainda está presente na proteína de fusão, formada pelos resíduos AGRGDCALG, onde na proteína selvagem contém resíduos mais hidrofóbicos WVLDSVALY. Por último, há uma notável diferença na extremidade C-terminal das estruturas, porque apesar da similaridade após a última  $\alpha 3$ , a proteína de fusão perde grande parte do segmento a seguir. Apesar das similaridades entre a proteína selvagem e a predita, as pequenas alterações conformacionais observadas e as interações dos aminoácidos da estrutura podem afetar de forma considerável sua estabilidade e função.

Figura 10. Diferenças estruturais entre as proteínas BRCA1 e BRCA1-VAT1



A) Estrutura predita da proteína BRCA1 selvagem e seu gráfico de Ångströms, demonstrando a estimativa de erro ao longo da sequência proteica, indicando a confiança na predição estrutural por resíduo; B) Estrutura predita da proteína de fusão BRCA1-VAT1 e seu gráfico de Ångströms. As setas amarelas indicam  $\alpha$  hélice 2 em ambas estruturas, as setas laranjas apontam para a folha  $\beta$ 4, as setas rosa indicam a  $\alpha$ -hélice 3 e a seta roxa a extremidade COOH.

FONTE: Imagem gerada pela autora, usando o software de Robetta)

### 3.1.1.1 Modelagem por homologia e *docking* molecular

Dentre os diversos parceiros de interação de BRCA1, destacam-se BACH1, CtIP, ACCA e Abraxas, que compartilham a sequência conservada de interação pSer-X-X-Phe e desempenham papéis cruciais na carcinogênese. Esses parceiros atuam diretamente ou facilitam a formação de complexos multiproteicos com BRCA1, influenciando sua função. Para investigar o impacto da fusão *BRCA1-VAT1*, que causa truncamento do domínio BRCT\_rpt2 sobre as interações proteína-proteína estabelecidas pela BRCA1 selvagem, foi realizado um *docking* molecular utilizando o programa MOE. Essa abordagem, amplamente empregada no estudo do câncer, permite prever e analisar a afinidade e a especificidade das interações moleculares, auxiliando na identificação de potenciais alvos terapêuticos. No presente trabalho, a modelagem computacional contribui para compreensão dos impactos estruturais da fusão *BRCA1-VAT1* sobre a função dos domínios BRCT.

Uma vez que a fusão *BRCA1-VAT1* culminou em alterações em apenas uma porção do segundo domínio BRCT da proteína BRCA1, as análises do *docking* teve como foco os domínios BRCT

em *tandem*, tendo na proteína quimérica a seguinte sequência:  
 DRKIFRGGLEICCYGPFTNMPTDQLEWMVQLCGASVVKELSSFTLGTGVHPIVVVQPD  
 AWTEDNGFHGRRPGDGVPEVRDVAGRGDCALGPDLPDS

No alinhamento entre sequência selvagem e a sequência de fusão da região dos domínios BRCT em *tandem*, realizado no programa MOE (Fig 1.1), houve 97% de similaridade entre os domínios, sendo possível visualizar a posição exata onde, a partir do aminoácido Ala1823, ocorre a interrupção da sequência selvagem do BRCA1 e a inserção da sequência derivada de VAT1 (Fig. 11).

Figura 11. Alinhamento sequência BRCT selvagem x sequência quimérica

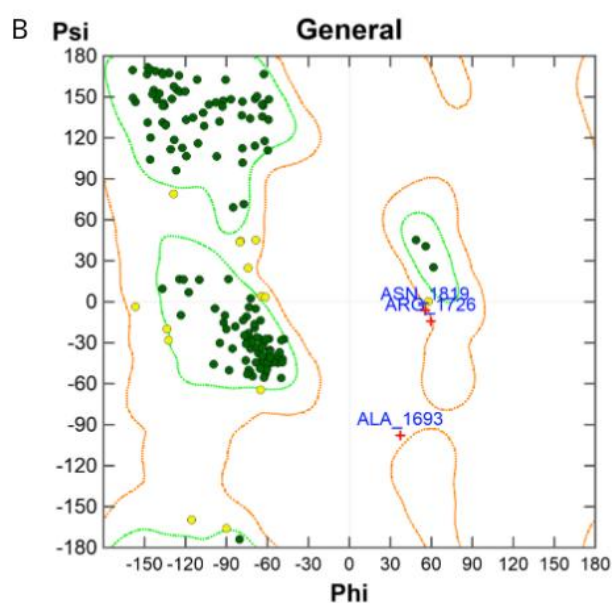
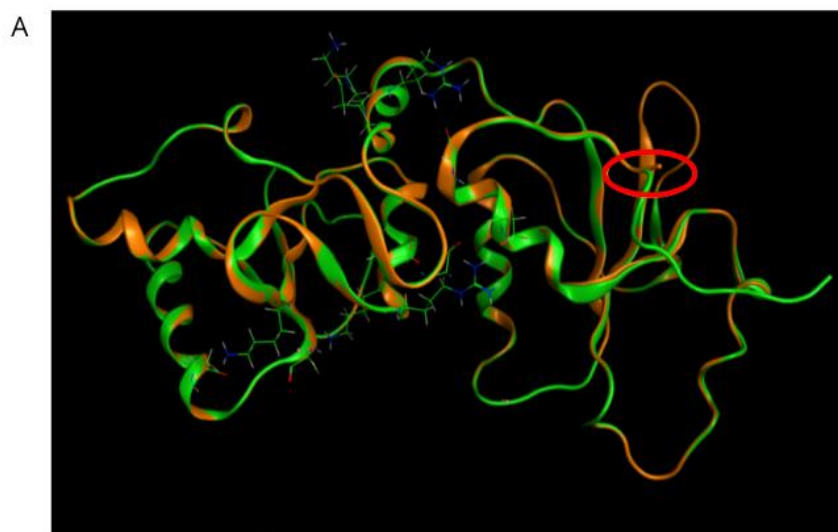


O alinhamento mostra a região do ponto de fusão, a linha superior ilustra a proteína selvagem e a inferior a sequência de aminoácidos da proteína de fusão. Destacado em vermelho está o ponto de início da alteração.

FONTE: Gerada por Me. Carlos Araújo, usando o software MOE.

Para identificar diferenças estruturais entre a proteína selvagem e quimérica, foi realizada a predição da estrutura 3D da proteína gerada por *BRCA1-VAT1*, focando apenas na região onde se localizam os domínios BRCT em tandem. A estrutura tridimensional predita seguiu o padrão da estrutura secundária, notando-se uma alteração apenas na porção final do segundo domínio BRCT (Fig.12). A estrutura tridimensional predita foi validada a partir do gráfico Phi/Psi de Ramachandran, indicando uma estrutura razoável para os padrões de predição por homologia, com 98,5% dos resíduos nas regiões que indicam ângulos permitidos (*Allowed*, pontos verdes, e *Core*, pontos amarelos/MOE), e 1,5% apontados como *outliers* (cruzes vermelhas) (Fig. 12).

Figura 12. Sobreposição das estruturas 3D dos domínios BRCTs selvagem e quimérico



Em A, é mostrada a sobreposição entre a estrutura selvagem (em verde) e o modelo predito (em laranja). O círculo vermelho destaca a região truncada na proteína modelada; Em B, tem-se o Diagrama de Ramachandran, representando a distribuição dos ângulos Phi e Psi dos aminoácidos na estrutura tridimensional da proteína de fusão BRCA1-VAT1. Os pontos amarelos correspondem à região de *core*, os pontos verdes indicam resíduos em regiões permitidas, e as cruzes vermelhas representam os *outliers*, ou seja, os resíduos em conformações não aceitas.

FONTE: Gerada por Me. Carlos Araújo. usando o software MOE

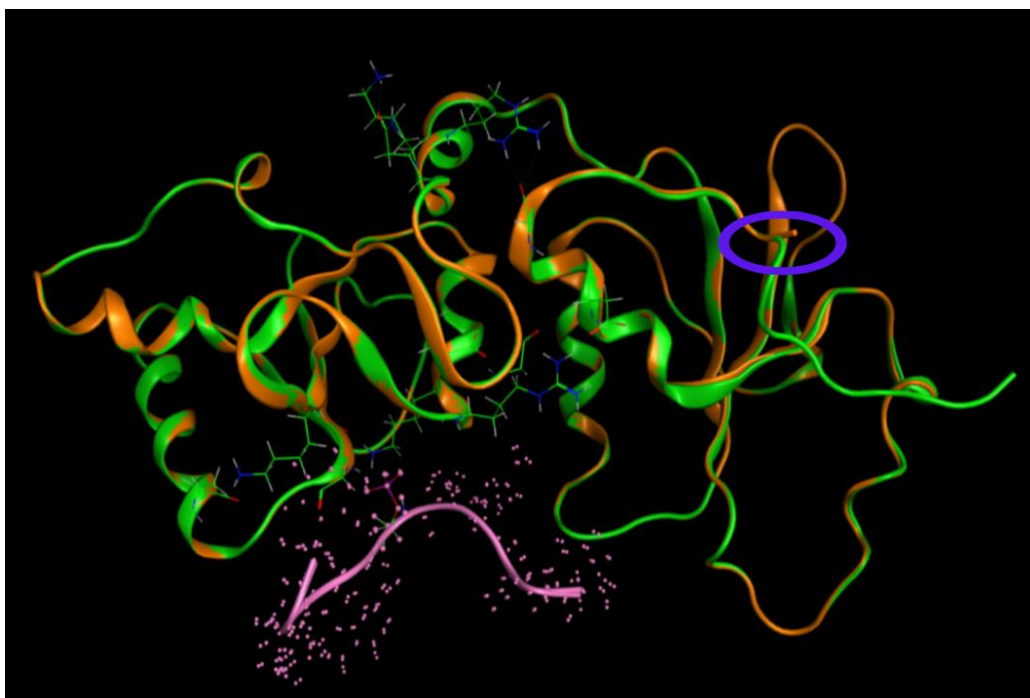
A existência de resíduos em posições não aceitas, em termos conformacionais, sugere que a proteína de fusão possa não ter uma estrutura tridimensional estável, o que poderia afetar a sua meia-vida, uma vez que a instabilidade em C-terminal pode encaminhar a proteína para

degradação. A instabilidade é dependente de condições do meio e, no caso, o ambiente tumoral é diferente do ambiente celular normal. Também é afetada pelas características biofísicas do local de expressão (citoplasmática e nuclear), pela disponibilidade de chaperonas e pelo quanto a habilidade de estabelecer os complexos funcionais usuais estiver preservada.

#### 3.1.1.1.1 Abraxas

Foi utilizada a estrutura cristalizada ID 4JLU - PDB-RCSB como modelo para a comparação de ligação e estabilidade entre o domínio BRCT\_BRCA1 quimérico e o selvagem, em complexo com o ligante Abraxas. A predição estrutural do domínio quimérico com o ligante só apresentou alterações na porção final, sendo possível notar um encurtamento da extremidade C-terminal na imagem de sobreposição com o modelo cristalizado (Fig. 13).

*Figura 13. Sobreposição entre a estrutura ID 4JLU e o domínio quimérico com o ligante Abraxas.*



A imagem ilustra a sobreposição da estrutura ID 4JLU, representada em verde, e a estrutura predita, em laranja. Em rosa, encontra-se o ligante Abraxas. O círculo azul destaca a região truncada na proteína quimérica.

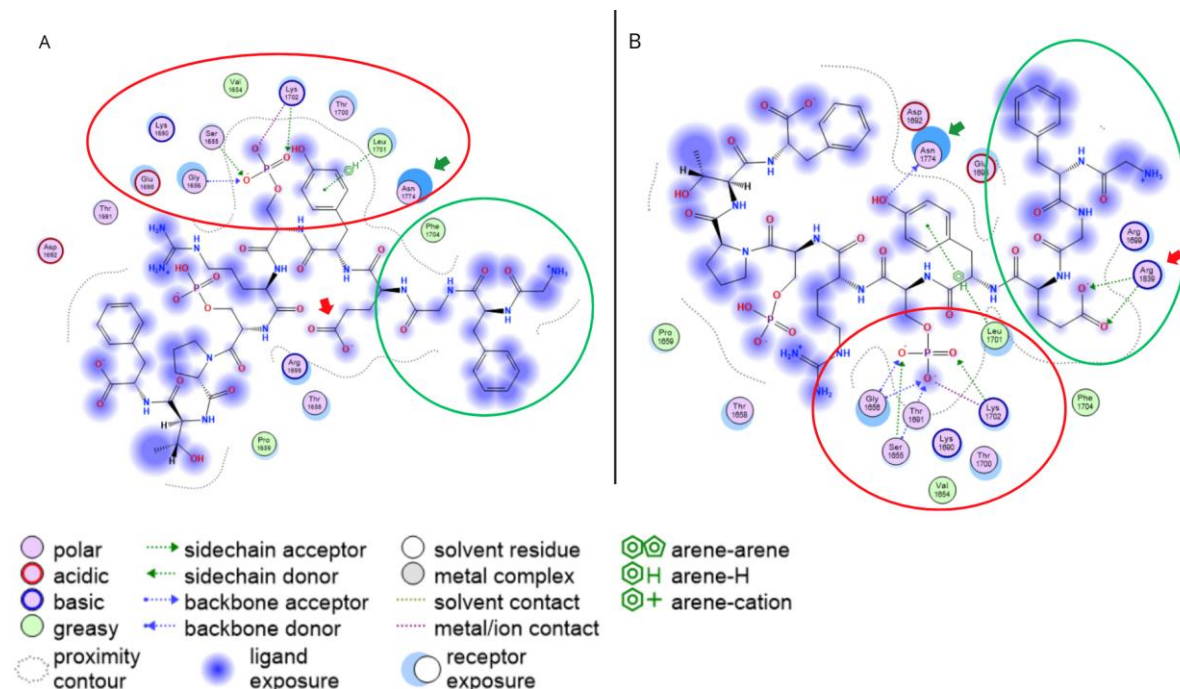
FONTE: Gerada por Me. Carlos Araújo. usando o software MOE

Na avaliação da energia potencial, que representa a energia livre de ligação entre o ligante e a proteína indicando a estabilidade da interação, não foi observada diferença importante entre o modelo selvagem -3.907,09 para o quimérico -3.926,02. O mesmo ocorreu no *docking*

molecular. Enquanto o domínio selvagem apresentou um *S-score* de -9,1739, o valor para o modelo quimérico foi de -9,4257. O *S-score* ou *score* do *docking*, que indica quão bem o ligante se encaixa na proteína, sugere que a formação do complexo não foi prejudicada.

Contudo, no mapa de interações, observou-se que algumas cadeias do Abraxas sofreram torções alterando as regiões de interação em comparação à ligação com a proteína selvagem (Fig. 14). Uma provável causa dessa torção seria a substituição da Leu1839 por uma Arg, criando uma interação com um grupo carboxila do Abraxas, que não existia com a proteína selvagem. A Arg1839 da proteína de fusão tornou-se doadora de cadeia lateral de ambos os oxigênios do grupo carboxilato. Essa interação pode ter sido responsável pela dobra da porção N-terminal do ligante, que passou a se posicionar entre a Asn1774 e a Phe1704 da proteína quimérica. Com isso, o grupo fosfato de Abraxas, que antes se encontrava entre os aminoácidos Asn1774 e Glu1698 da proteína selvagem, também muda de posição, passando a se posicionar entre os aminoácidos Phe1704 e Pro1659 da proteína quimérica. Interessante nesse caso, é que também há uma mudança na conformação do BRCT, pois as interações do grupo fosfato com a Lys1702, Ser1655 e Gly1656 são mantidas, mesmo com o deslocamento para outra região da proteína quimérica. Além disso, os resíduos Ser1655 e Gly1656, que na proteína selvagem atuam como aceptores da cadeia lateral do grupamento fosfato por meio de um único oxigênio, passaram a estabelecer duas ligações com a proteína quimérica. Em consequência da torção das cadeias, o resíduo Asn1774, que na proteína normal aparece apenas como um receptor polar exposto, na proteína quimérica age também como umceptor da cadeia lateral de uma hidroxila da Abraxas. Todas essas mudanças podem afetar a forma como o complexo atuará nas reações subsequentes. Por isso, apesar de não apresentar diferença significativa na energia de ligação, é possível que a função do complexo seja modificada, caso seja formado (Fig. 14).

Figura 14. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com a ligante Abraxas



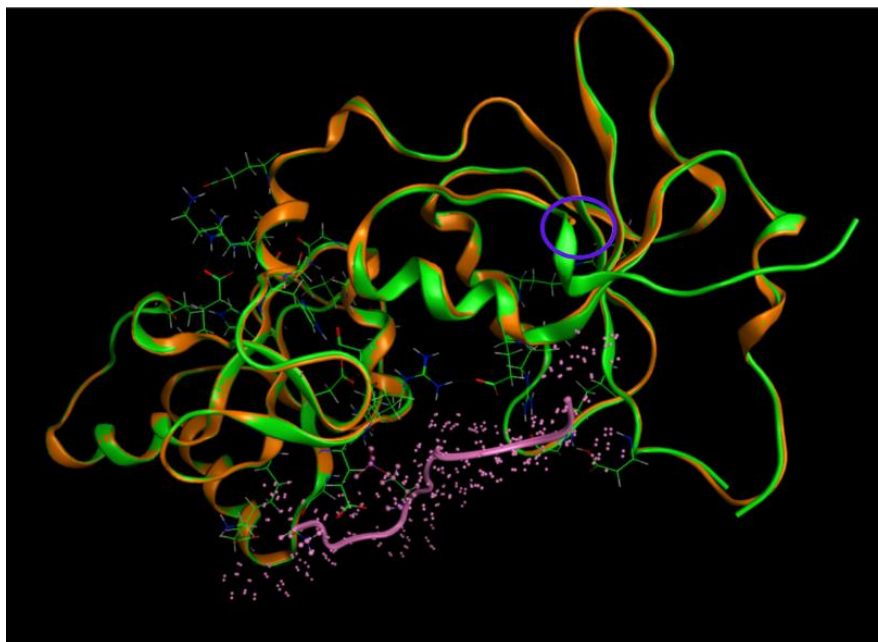
Comparação dos mapas de interação da proteína selvagem (A) e quimérica (B) com o ligante Abraxas. Na imagem B está a Arg1839 (seta vermelha) que atua como doador da cadeia lateral de ambos os oxigênios do grupo carboxilato. Na imagem A (seta vermelha) é possível ver o grupamento sem nenhuma interação na sua posição normal. Em ambas as figuras (A e B) a porção N-terminal está destacada em verde. O grupamento fosfato que teve sua localização alterada está destacado pelo círculo vermelho (A e B). Asn1774 passa a estabelecer ligação na proteína quimérica (Seta verde).

FONTE: Adaptado pela autora, gerada por Carlos Araújo, Me. usando o software MOE.

### 3.1.1.1.2 BACH1

Para as análises envolvendo BACH1, foi utilizada a estrutura cristalizada ID 1T29 - PDB-RCSB como modelo. Na predição da estrutura de fusão com o ligante, só houve alteração expressiva na extremidade C-terminal, como indicado na imagem de sobreposição (Fig. 15).

Figura 15. Sobreposição entre a estrutura dos domínios cristalizados BRCTs\_BRCA1 e os domínios BRCTs\_BRCA1 quimérico com o ligante BACH1



A imagem de sobreposição ilustra a estrutura ID 1T29, representada em verde, e a estrutura predita da proteína de fusão BRCA1-VAT1., em laranja. Em rosa, encontra-se o ligante BACH1. O círculo azul destaca a região truncada na proteína quimérica.

FONTE: FONTE: Adaptado pela autora, gerada por Carlos Araújo, Me. usando o software MOE.

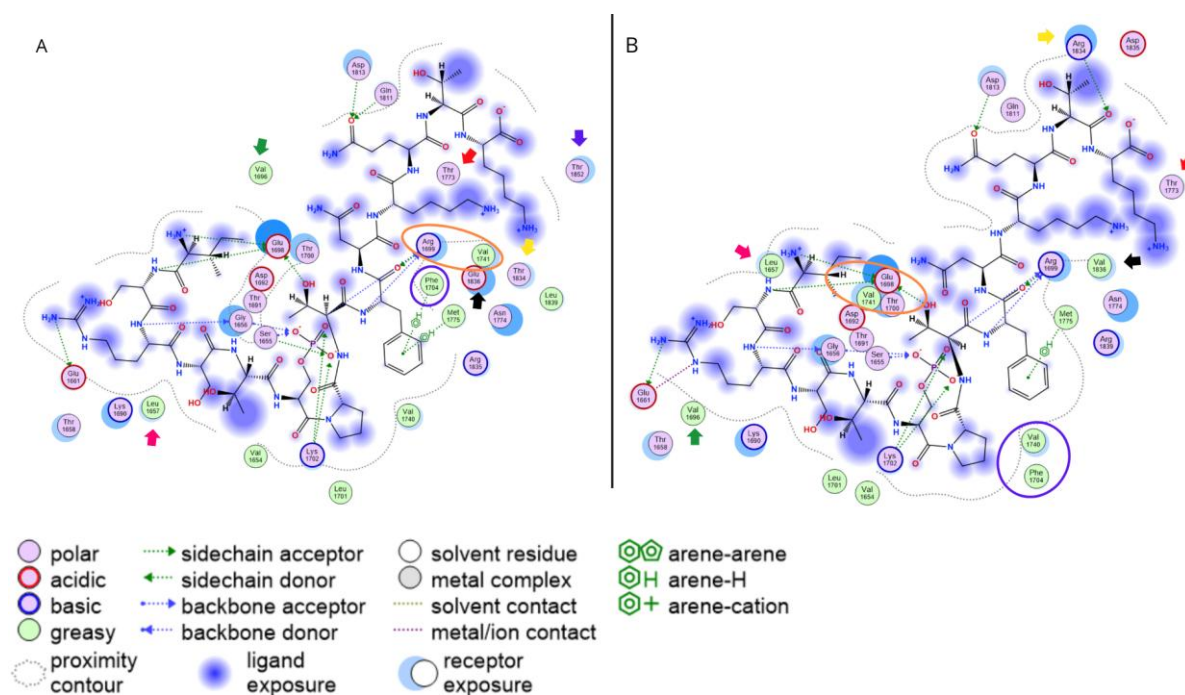
A energia potencial para as duas estruturas não mostrou diferenças significativas (-4.867,80 para estrutura selvagem, e -5.046,76 para a quimérica), indicando que as interações têm estabilidades semelhantes.

Após avaliar a condição estrutural da proteína de fusão, foi investigada sua interação com o ligante BACH1 por meio de *docking* molecular, onde não foram observadas diferenças significativas no *S-score* entre a estrutura modelo (-15,2353) e a estrutura predita (-14,8711), sugerindo que a formação do complexo seria viável.

Todavia, o mapa de interações revelou um maior número de resíduos interagindo diretamente com BACH1 nos domínios BRCTs em *tandem* da proteína selvagem (Fig. 16). Além disso, nos domínios BRCTs em *tandem da proteína* quimérica, diversos resíduos apresentaram-se em posições diferentes. A Thr1773 da proteína selvagem, que aparecia entre duas cadeias do ligante, aparece externa a essas cadeias próximo à localização da Thr1852 selvagem, que não

existe na proteína quimérica, uma vez que a proteína é truncada na posição 1851. Essa mudança na conformação do domínio BRCT pode ter sido influenciada pela substituição ocorrida na posição 1834 (Thr por Arg), resultando na ligação de uma Arginina a um grupo carbonila de BACH1. Outros aminoácidos, que indicam uma mudança na conformação do BRCT, são Leu1657 e a Val1696, que aparecem em lados opostos do ligante quando comparamos as proteínas selvagem e quimérica, e a Val1741 e Phe1704. Por fim, substituições de aminoácidos, que ocorreram na proteína quimérica a partir da posição 1822, alteram a exposição de dois resíduos presentes na proteína selvagem, a Glu1836 (Val) e a Thr1834 (Arg). Portanto, no caso da formação do complexo com BACH1, percebe-se uma alteração maior por parte da conformação da proteína quimérica e não tanto de torções das cadeias do ligante (Fig. 16).

*Figura 16. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com ligante BACH1*



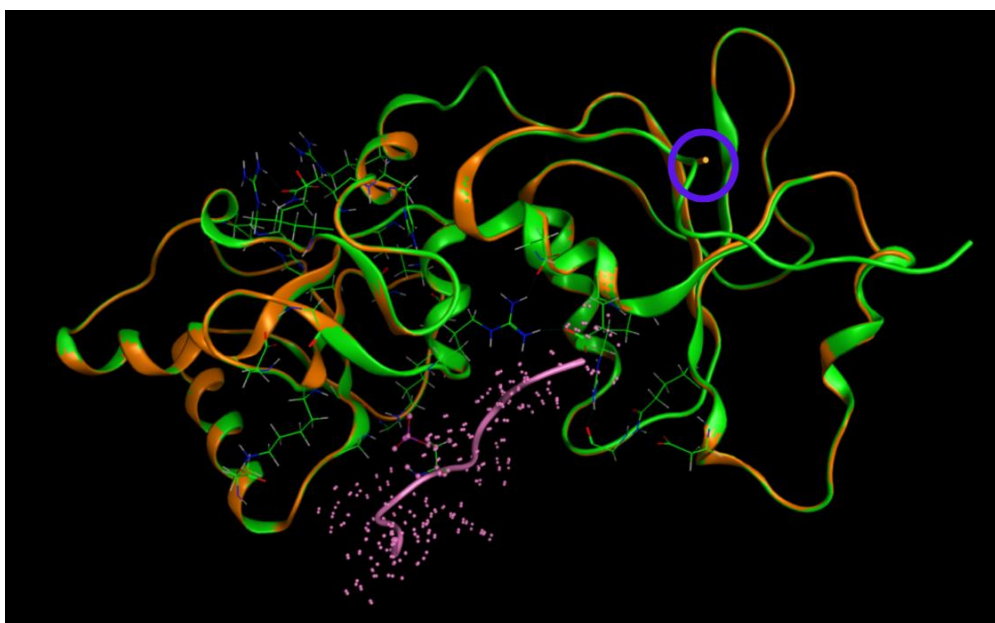
Mapa de interações entre o domínio selvagem (A) e o modelo quimérico (B) com a ligante BACH1. A Thr1773 (setas vermelhas) da proteína selvagem, que estava entre duas cadeias do ligante, desloca-se para fora dessas cadeias, próximo à Thr1852 (seta azul), que não está presente na proteína quimérica devido ao truncamento em 1851. A substituição da Thr1834 por Arg (setas amarelas) causa uma nova ligação entre a Arg1834 e o grupo carbonila do BACH1. Outras mudanças incluem a Leu1657 (setas rosa) e Val1696 (setas verdes), que se posicionam em lados opostos do ligante nas duas formas. A substituição de aminoácidos a partir da posição 1822, Glu1836 por Val e Thr1834 por Arg, (setas pretas e amarelas, respectivamente) altera a exposição de receptores da proteína selvagem. Val1741 e Phe1704 perdem sua ligação na proteína quimérica (círculos laranjas e azuis).

FONTE: Adaptado pela autora, gerada por Carlos Araújo, Me. usando o software MOE.

### 3.1.1.1.3 CtIP

As comparações de ligações em CtIP foram realizadas a partir da estrutura cristalizada ID 3COJ - PDB-RCSB. Como descrito acima, a proteína quimérica predita só demonstrou um encurtamento na região terminal (Fig 17).

*Figura 17. Sobreposição entre a estrutura dos domínios cristalizados BRCTs\_BRCA1 e os domínios BRCTs\_BRCA1 quimérico com ligante CtIP*



A imagem ilustra a sobreposição da estrutura ID 1T29, representada em verde, e da estrutura predita, em laranja. Em rosa, encontra-se o ligante CtIP. O círculo azul destaca a região truncada na proteína quimérica.

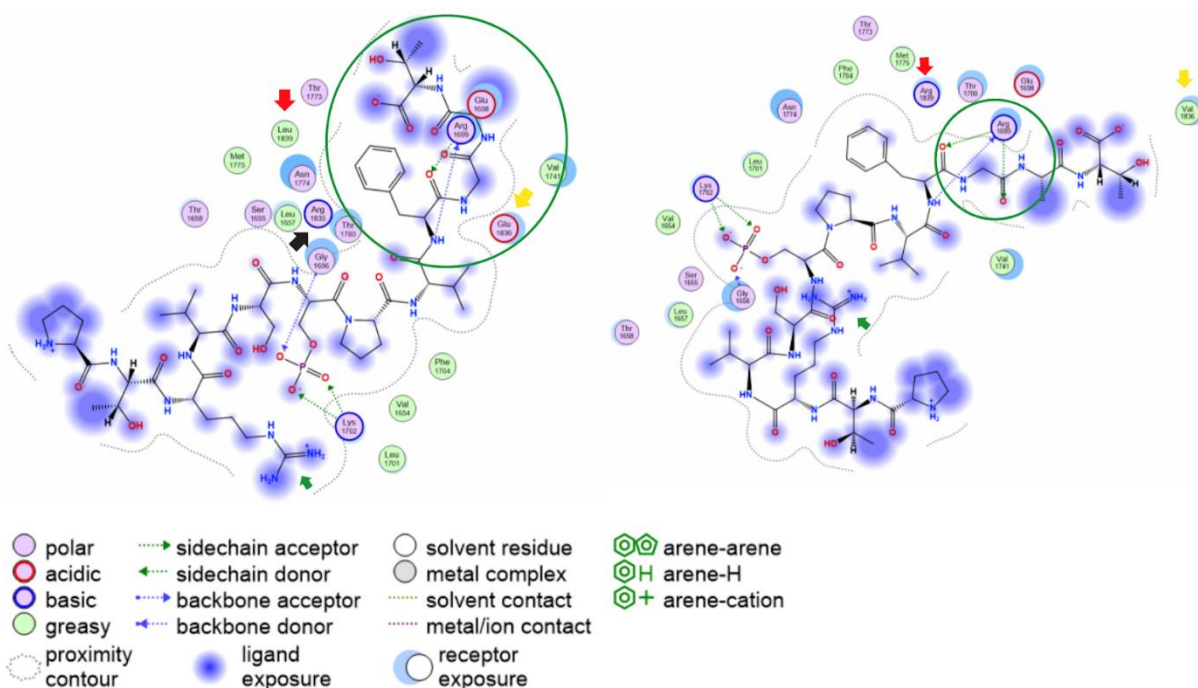
FONTE: Adaptado pela autora, gerada por Carlos Araújo, Me. usando o software MOE.

A análise da energia potencial não revelou diferenças significativas entre as duas estruturas, -4.777,33 para domínio selvagem, e -4.853,55 para a proteína de fusão. Da mesma forma, os resultados do docking também não apresentaram diferenças significativas entre o modelo ID 3COJ (-10,1605) e a proteína quimérica predita (-10,8408). Estes dados sugerem que o truncamento do domínio BRCT e da região C-terminal na proteína de fusão não afetariam a formação do complexo BRCA1-VAT1 com CtIP.

Já, o mapa de interações indicou mudanças estruturais nas posições das cadeias do ligante, como a torção completa da cadeia N-terminal do CtIP, o que pode influenciar a ocorrência e estabilidade das ligações do complexo no contexto celular (Fig. 18). Na proteína quimérica, os resíduos Val1836 (resultante da substituição p.Glu1836Val) e Arg1839 (resultante da substituição p.Leu1839Arg) atuam como receptores expostos para interação, enquanto o

resíduo Arg1699 passa a formar uma ligação adicional com um segundo grupo carbonila, atuando como doador da cadeia lateral. Os resíduos Arg1835, Glu1836 e Leu1839, que estavam presentes na proteína selvagem, foram substituídos, respectivamente, pelos aminoácidos Asp, Val e Arg na proteína quimérica, o que também pode ter influenciado na nova conformação das cadeias do ligante (Fig. 18).

Figura 18. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com ligante CtIP



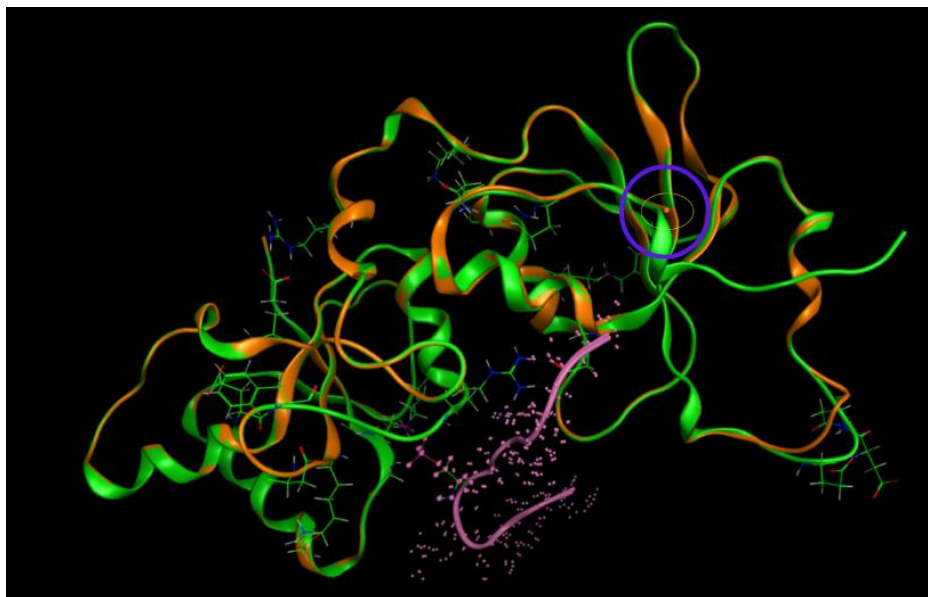
Mapa de interações entre a proteína selvagem (A) e o domínio quimérico (B) com o ligante CtIP. Os resíduos Val1836 (B - seta amarela) e Arg1839 (B - seta vermelha), que substituíram os aminoácidos Glu (A - seta amarela) e Leu (A - seta vermelha), respectivamente, atuam como receptores expostos para interação. O resíduo Arg1699 (círculos verdes), na proteína quimérica, forma uma nova ligação com um segundo grupo carbonila, funcionando como doador da cadeia lateral. As substituições de aminoácidos na proteína quimérica Arg1835Asp (seta preta), Glu1836Val, e Leu1839Arg podem ter influenciado na nova conformação das cadeias do ligante. Houve também a torção completa da cadeia N-terminal (seta verde).

FONTE: Adaptado pela autora, gerada por Carlos Araújo, Me. usando o software MOE.

#### 3.1.1.1.4 ACCA

Para avaliar a formação do complexo com ACCA, utilizou-se como modelo a estrutura cristalizada ID 3COJ - PDB-RCSB. Como esperado, a partir da sobreposição do domínio selvagem com o predito, a proteína quimérica só demonstrou um encurtamento na região terminal (Fig 19).

Figura 19. Sobreposição entre a estrutura dos domínios cristalizados BRCTs\_BRCA1 e os domínios BRCTs\_BRCA1 quimérico com o ligante ACCA



A imagem ilustra a sobreposição da estrutura ID 3COJ, representada em verde, e da estrutura predita, em laranja. Em rosa, encontra-se o ligante ACCA. O círculo azul destaca a região truncada na proteína quimérica.

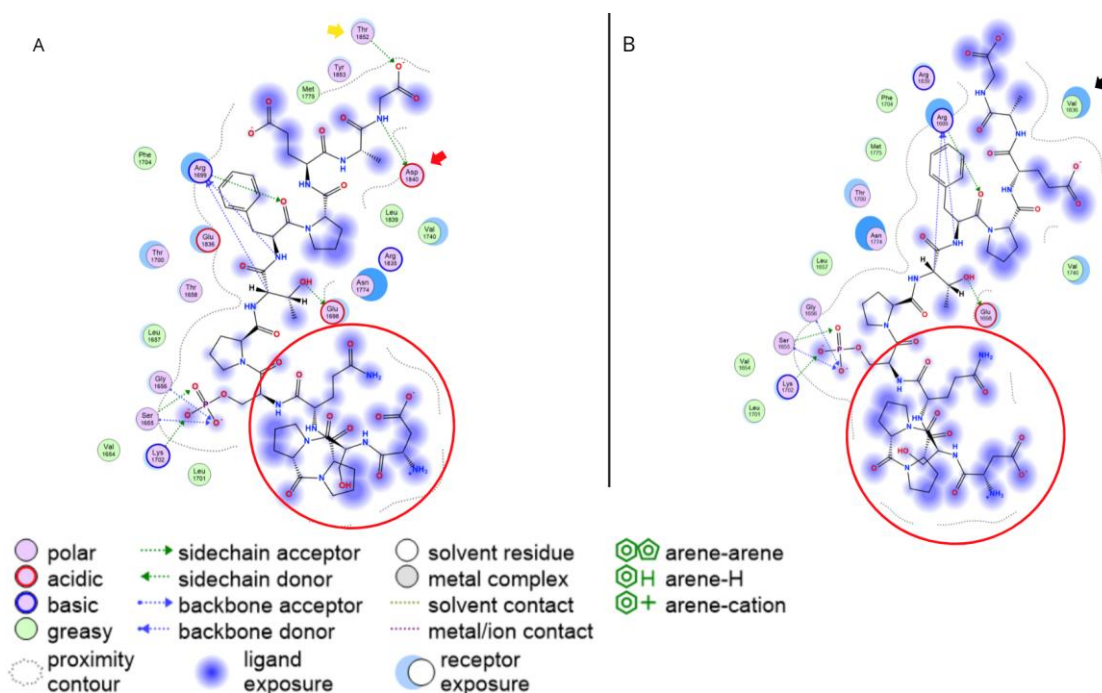
FONTE: Adaptado pela autora, gerada por Carlos Araújo, Me. usando o software MOE.

A energia potencial de -4.447,13 para o domínio selvagem e -4.460,03 para o quimérico não indicou diferenças importantes entre as duas estruturas. Da mesma forma, os resultados do *docking* molecular não apontaram variações relevantes no S-score entre a estrutura cristalizada 3COJ (-10,5592) e a estrutura predita (-10,4715). Portanto, baseando-se apenas nesses parâmetros, não há evidências de que a presença do domínio quimérico afete a formação do complexo com ACCA.

O mapa de interações revela um maior número de resíduos interagindo diretamente com ACCA na estrutura selvagem (Fig. 20). Além disso, observa-se uma torção na cadeia do ligante, possivelmente explicada pela perda das ligações, que na proteína selvagem são realizadas por Asp1840 e Thr1852. Na posição 1840 do domínio quimérico, Asp foi substituído por Gly, e Thr1852 perdeu-se devido ao truncamento ocorrido no resíduo 1851. Em contrapartida, uma nova interação surge no domínio quimérico por meio da Val1836. Outra torção é evidente na cadeia localizada na parte inferior da imagem (Fig. 20), com inversão do grupamento acetamido, além de alterações no grupo éster e na hidroxila. Além disso, nota-se uma sutil

mudança conformacional em comparação ao domínio selvagem, sugerindo que essas modificações estruturais podem impactar suas interações.

*Figura 20. Mapa de interações dos domínios BRCT da proteína selvagem X domínios da proteína quimérica com ligante ACCA*



Estrutura cristalizada (A) e domínio quimérico (B) interagindo com o ligante ACCA. Na posição 1840 do domínio quimérico, a substituição de Asp por Gly (seta vermelha) e a perda de Thr1852 (seta amarela) resultaram em mudanças conformacionais. Há uma nova interação mediada por Val1836 (seta preta). Além disso, observa-se uma torção na cadeia inferior (círculo vermelho), com inversão de grupamentos químicos, sugerindo impacto na interação com o ligante.

FONTE: Adaptado pela autora, gerada por Carlos Araújo, MSc. usando o software MOE.

A validação dos resultados de docking foi realizada por meio da análise do desvio quadrático médio (RMSD – root-mean-square deviation), com o objetivo de avaliar a confiabilidade das conformações previstas para os ligantes Abraxas, BACH1, CtIP e P-ACCA. Os valores obtidos de RMSD foram, respectivamente, 1.2083, 1.1017, 1.8864 e 0.7814. Como todos os resultados se mantiveram abaixo do valor de 2, considerado um limite aceitável para indicar uma boa sobreposição entre a estrutura prevista e a referência, é possível afirmar que os modelos gerados são confiáveis e adequados para interpretações posteriores.

Apesar da energia potencial e do *s-score* indicarem a formação do complexo, as mudanças conformacionais observadas tanto no ligante quanto no domínio quimérico podem comprometer a função do complexo, já que a alteração no padrão de exposição de determinados átomos pode impactar suas interações e estabilidade à jusante.

### 3.1.1.2 Funções das interações BRCT com fosfopeptídeos

Embora os valores da energia potencial e do *S-score* não tenham indicado diferenças significativas, que impeçam a formação de qualquer dos complexos analisados, as mudanças estruturais observadas nos ligantes podem influenciar esse processo. No contexto tridimensional, as conformações resultantes das alterações podem afetar a funcionalidade do complexo formado. Dito isso, buscou-se na literatura embasamento teórico para investigar os possíveis efeitos dessas alterações, além das funções desempenhadas por cada uma delas no contexto da Oncologia.

Nesse sentido, em camundongos, a interação BRCA1-Abraxas medeia a formação de um complexo maior, composto por BARD1, BRCA1, Abraxa, NBA1, BRE, BRCC36 e Rap80 (homólogo da Ubiquitin Interaction Motif Containing 1, UIMC1, de humanos), que desempenha um papel importante na mediação do recrutamento de BRCA1 para as quebras de fita dupla do DNA (CASTILLO et. al., 2014). Células de camundongos *knockout* para Abraxa e Rap80, expostas à radiação ionizante e coradas com  $\gamma$ H2AX (um marcador de DNA danificado) mostraram focos de  $\gamma$ H2AX de forma constante no período de 7 horas após exposição, indicando uma deficiência no reparo do DNA. Já as células selvagens diminuíram a porcentagem de focos de  $\gamma$ H2AX ao longo do tempo (CASTILLO et. al., 2014).

Além disso, durante a fase S/G2 do ciclo celular, BACH1 forma focos nucleares localizados com BRCA1, sendo esse o período que ocorre a fosforilação da S990 de BACH1. Ademais, mutações em BACH1, que comprometam sua interação com BRCA1, interrompem o reparo das quebras de fita dupla via ativação da reparo por recombinação homóloga (CANTOR et al., 2001). Nessa fase, o complexo BARD1-BRCA1-BACH1 atua impedindo a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) e favorecendo o reparo por recombinação homóloga. (MOREAU et al., 2006).

Já a interação entre BRCA1 e CtIP desempenha diferentes funções, dependendo do estado de fosforilação e ubiquitinação, dos outros parceiros de interação e do estágio do ciclo celular

(OLIVEIRA; KYRIACOU, 2012). Na fase G2/M, quando em complexo, CtIP inibe BRCA1 de induzir a expressão e ativação do gene *GADD45* (LI et al., 2000). Contudo, quando exposta à radiação ionizante, CtIP sofre hiperfosforilação pela serina/treonina quinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated) nos resíduos de Ser664 e Ser745, dissociando-se de BRCA1 (LI et al., 2000). Essa dissociação permite que BRCA1 induza a expressão de *GADD45*, criando uma rede de interação, que resulta na fosforilação das quinases JNK/SAPK e culmina em apoptose celular (OLIVEIRA; KYRIACOU, 2012). Assim, nessas condições, o complexo formado por BRCA1 e CtIP desempenha um papel essencial no ponto de checagem G2/M e na regulação da apoptose. Por outro lado, quando fosforilado na Ser327, CtIP forma um complexo com BRCA1 atuando no ponto de checagem G2/M. A interação é capaz de regular a ativação de CHK1, uma proteína serina/treonina quinase, que desempenha a função de retardar a progressão da divisão celular para que o DNA danificado seja reparado (YU; CHEN, 2004). No ponto de checagem S/G2, a interação do complexo CtIP com o complexo MRN (Mre11, Rad50 e Nbs1) promove a ressecção das quebras de fita dupla, contribuindo com o reparo do DNA pela via de recombinação homóloga e bloqueando a união de extremidades não-homólogas (NHEJ) (CHEN et al., 2008).

Por fim, interações fosfo-dependentes entre os domínios BRCT em tandem do BRCA1 e a enzima limitante da lipogênese *de novo*, ACCA, foram relatadas (SHEN; TONG 2008; MAGNARD, et al. 2002). Em sua forma ativa, ACCA é responsável por catalisar a carboxilação de acetil-CoA, gerando malonil-CoA, que é utilizado pela enzima FAS (do Inglês, *Fatty Acid Synthase*) para a síntese de ácidos graxos. No complexo, o BRCA1 estabiliza a fosforilação da ACCA, deixando-a em sua forma inativa e conseqüentemente impedindo a carboxilação da acetil-CoA (MOREAU et al., 2006). Mutações, que interferem na formação do complexo BRCA1-ACCA, desregulam o controle da atividade enzimática da ACCA, contribuindo para a lipogênese (MOREAU et al., 2006). O silenciamento de FAS e ACCA, com RNA de interferência (RNAi), gerou inibição da proliferação celular e a indução de apoptose de células de câncer de próstata, mas não em células não malignas e com baixa atividade lipogênica (BRUSSELMANS et al., 2005).

Considerando o exposto, as possíveis conseqüências estruturais, de estabilidade e afinidade de ligação resultantes da fusão *BRCA1-VAT1* possivelmente implicam em uma série de impactos negativos no funcionamento celular. De acordo com a função dos ligantes estudados, tais alterações podem comprometer a capacidade de reparo do DNA por meio de diferentes mecanismos, impedir a degradação de células danificadas e favorecer a síntese de lipídios,

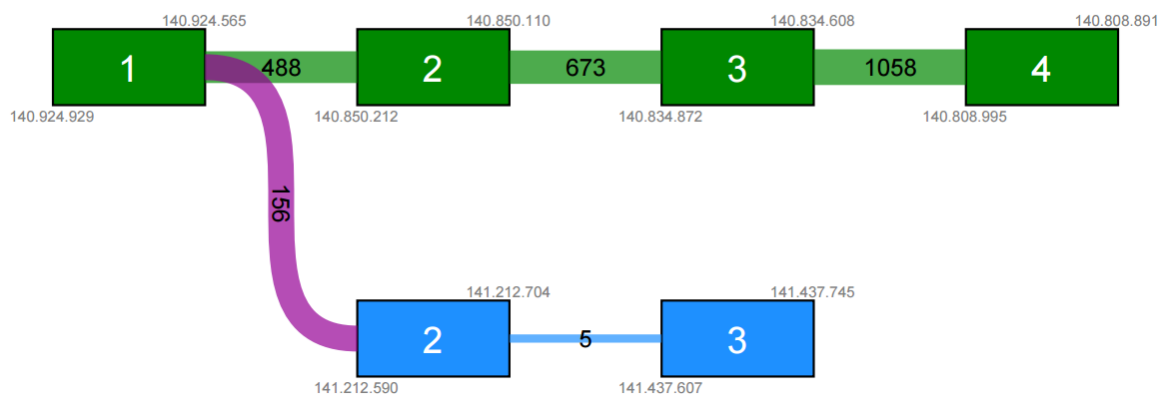
contribuindo com atividades metabólicas associadas ao aumento de demanda energética. Esses distúrbios têm potencial para afetar a homeostase celular e contribuir para o desenvolvimento de patologias, como o câncer.

As divergências entre os resultados do *docking* molecular e os achados na literatura, como os de Clapperton et al. (2004), Li et al. (1999) e Williams et al. (2003), que relatam mutações e truncamentos da proteína nos mesmos aminoácidos alterados pela fusão, podem ser atribuídas às limitações da metodologia de *docking* molecular. No presente estudo, o *docking* molecular considerou as posições tanto do ligante quanto do receptor como fixas, o que não condiz com o contexto biológico dinâmico. Além disso, como os domínios em tandem dependem das interações entre si e com o ligante para se estabilizarem, essa simplificação pode ter influenciado significativamente a interação observada. Vale destacar que o *docking* molecular geralmente é realizado em vácuo, desconsiderando condições fisiológicas, características próprias do subsistema celular em questão (e.g., pH, salinidade, íons presentes), interações complexas com a membrana, cofatores, entre outros.

### 3.1.2 Fusão *BRAF-TMEM178B*

A fusão *BRAF-TMEM178B*, também detectada na paciente PCO65, ocorreu entre o gene *BRAF* na extremidade 5' e o gene *TMEM178B* na extremidade 3' (Fig. 21). Ambos os genes se encontram na mesma localização citogenética 7q34, no sentido cabeça-cabeça, a uma distância de 150 kb um do outro. Contudo, enquanto *BRAF* é transcrito da fita -, *TMEM178B* é transcrito da fita +. Os transcritos de referência para a fusão são: *NM\_004333.6* para o gene *BRAF*, do nucleotídeo 1 ao 364, e *NM\_001195278.2* para o gene *TMEM178B*, do nucleotídeo 630 ao 10.726. A fusão é apoiada por 156 *reads* de suporte. Para o fragmento selvagem, foram detectadas 488 leituras, logo a fusão possui uma frequência aproximada de 32%.

Figura 21. Fusão Gênica *BRAF-TMEM178B*



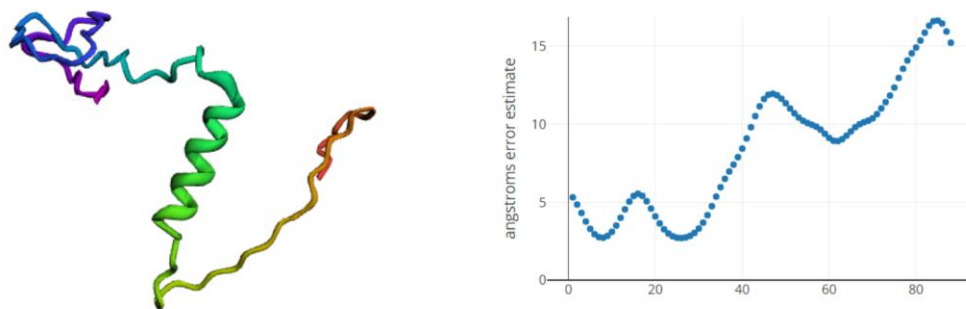
A fusão *BRAF-TMEM178B* ocorre entre o exon 1 do gene *BRAF* na extremidade 5' e o exon 2 do gene *TMEM178B* na extremidade 3.

FONTE: CLC Genomics Workbench 23

A CDS gerada a partir da fusão traduz-se em uma proteína com 88 aa, dos quais 46 são homólogos aos da proteína *BRAF* selvagem e os demais derivam da sequência proveniente do gene *TMEM178B*. Contudo, após o ponto de fusão, houve uma mudança na matriz de leitura, pois, apesar da fusão ocorrer nas bordas dos éxons, a fase de término de leitura do éxon 1 de *BRAF* é 0, enquanto a fase de início do éxon 2 de *TMEM178B* é 1.

A sequência homóloga a *BRAF* não possui nenhum domínio funcional conservado, uma vez que o primeiro domínio funcional se inicia no aminoácido 154 da proteína selvagem, e a fusão mantém apenas até o aminoácido 46. Além disso, a análise de conservação do fragmento derivado de *TMEM178B* na proteína quimérica não identificou qualquer homologia, sugerindo que a proteína de fusão não mantém nenhuma função conhecida. A predição da estrutura 3D da proteína está representada na Figura 22.

Figura 22. Predição da estrutura 3D da proteína quimérica *BRAF-TMEM178B*

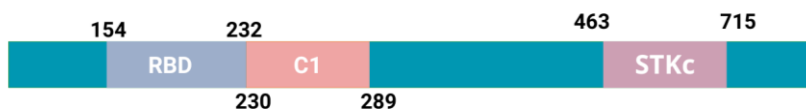


Predição 3D proteína *BRAF-TMEM178B* e sua estimativa de erro em Ångströms ao longo da sequência proteica, indicando a confiança na predição estrutural por resíduo.

FONTE: Criada pela autora usando o software Robetta.

A fusão *BRAF-TMEM178B* não foi encontrada na literatura. Embora pouco estudado, o gene *TMEM178B* codifica uma proteína integral de membrana (STELZER et al., 2016). O gene *BRAF*, por sua vez, é o proto-oncogene pertencente à família RAF, que em mamíferos é composta pelos genes *ARAF*, *BRAF* e *CRAF*, as proteínas dessa família compartilham três domínios conservados: CR1, CR2 e CR3 (ZAMAN; WU; BIOVANA, 2019). Em BRAF, esses domínios estão localizados nos seguintes intervalos (Fig 23): CR1 (154-232aa), CR2 (230-289aa) e CR3 (463-715aa) (WANG et al., 2023). O CR1, também conhecido como domínio de ligação a RAS (RBD), é responsável pela interação com RAS-GTP e desempenha um papel autorregulador. O CR2 ou domínio C1, é uma região rica em serina, funcionando como uma dobradiça flexível entre os domínios reguladores e catalíticos. Já CR3 é um domínio catalítico de serina/treonina quinase (STKc), responsável por catalisar a fosforilação de substratos protéicos, sendo fundamental para a atividade quinase da proteína (ZAMAN; WU; BIOVANA, 2019); WANG et al., 2023).

Figura 23. Domínios conservados BRAF

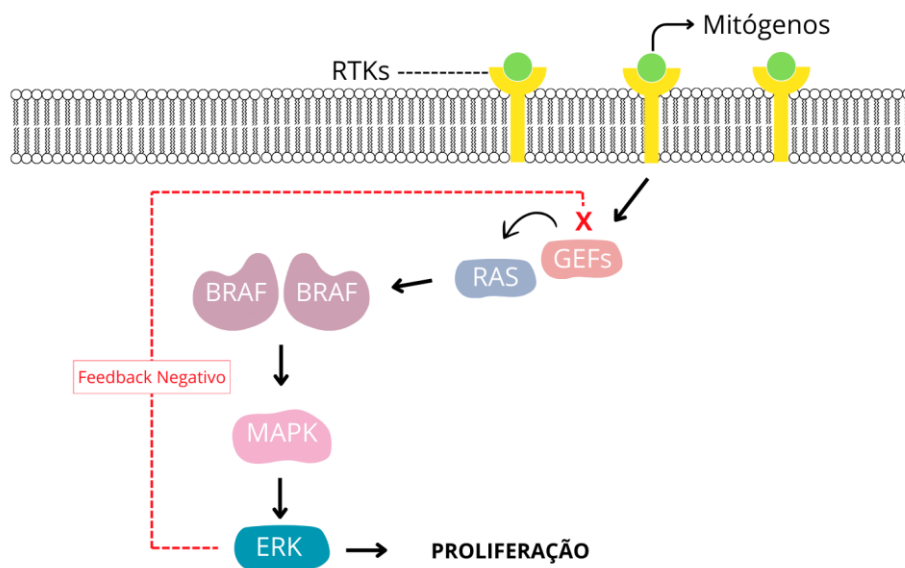


Domínios conservados BRAF, isoforma 1 (NP\_004324.2). RBD é o domínio de ligação a RAS e desempenha um papel autorregulador; C1, é uma região rica em serina, funcionando como uma dobradiça flexível entre os domínios reguladores e catalíticos; STKc é um domínio catalítico de serina/treonina quinase, responsável por catalisar a fosforilação de substratos protéicos, sendo fundamental para a atividade quinase da proteína.

FONTE: Criada pela aurora

Portanto, BRAF é uma serina/treonina quinase que, a partir da regulação por RAS ativado, inicia a cascata de sinalização MAPK/ERK (PERRONE et al., 2024). A cascata de sinalização (Fig. 24) tem início a partir de estímulos externos como fatores de crescimento, citocinas e hormônios, que ativam receptores tirosina quinase transmembranares (RTKs, do inglês *Receptor Tyrosine Kinases*) (WAN, et al., 2004). Após essa ativação, ocorre o recrutamento dos fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs, do inglês *guanine nucleotide exchange factors*), que promovem a troca de GDP por GTP em RAS, ativando-o. O RAS ativado interage com RAF, nessa via, de forma preferencial com BRAF (ŚMIECH et al., 2020), recrutando-o para a membrana, onde ocorre a homodimerização (BRAF-BRAF) ou a heterodimerização (BRAF-CRAF) e ativação da proteína (POULIKAKOS; SULLIVAN; YAEGER, 2022). Quando ativado, o BRAF fosforila quinases ativadas por mitógenos MEK1 e MEK2 (MAPK) que, então, fosforila as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2). ERK atua como moduladora, regulando a expressão de genes e sinais envolvidos no crescimento, proliferação e secreção celular, dependendo do contexto fisiológico (PERRONE, et al., 2024; ZAMAN; WU; BIOVANA, 2019; WELLBROCK; KARASARIDES; MARIAS, 2004). Em condições normais, e para manter a homeostase celular, a cascata metabólica gera diversos mecanismos de *feedback* negativo para evitar a proliferação exacerbada. Nesse contexto, ERK ativada age inibindo GEFs, além de aumentar a expressão das proteínas Sprouty1 e 2 (em camundongos) e DUSP, que inibem, respectivamente, RTKs e MAPKs (YAO et al., 2015; HOLDERFIELD et al., 2014; HANAFUSA et al., 2002).

Figura 24. Cascata de sinalização MAPK/ERK



A cascata tem início com fatores de crescimento, hormônios e citocinas (mitógenos) se ligando aos ativam receptores tirosina quinase transmembranares RTKs que recrutam Fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), promovendo a troca de GDP por GTP em RAS, ativando-o. RAS ativado interage com BRAF recrutando-o para a membrana, onde ocorre a homodimerização (BRAF-BRAF) ou a heterodimerização (BRAF-CRAF) e ativação de BRAF, que fosforila quinases ativadas por mitógenos MEK1 e MEK2 (MAPK) que, então, fosforila as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2). ERK além de regular proliferação, crescimento e secreção celular, desencadeia mecanismos de feedback negativo para o controle da via.

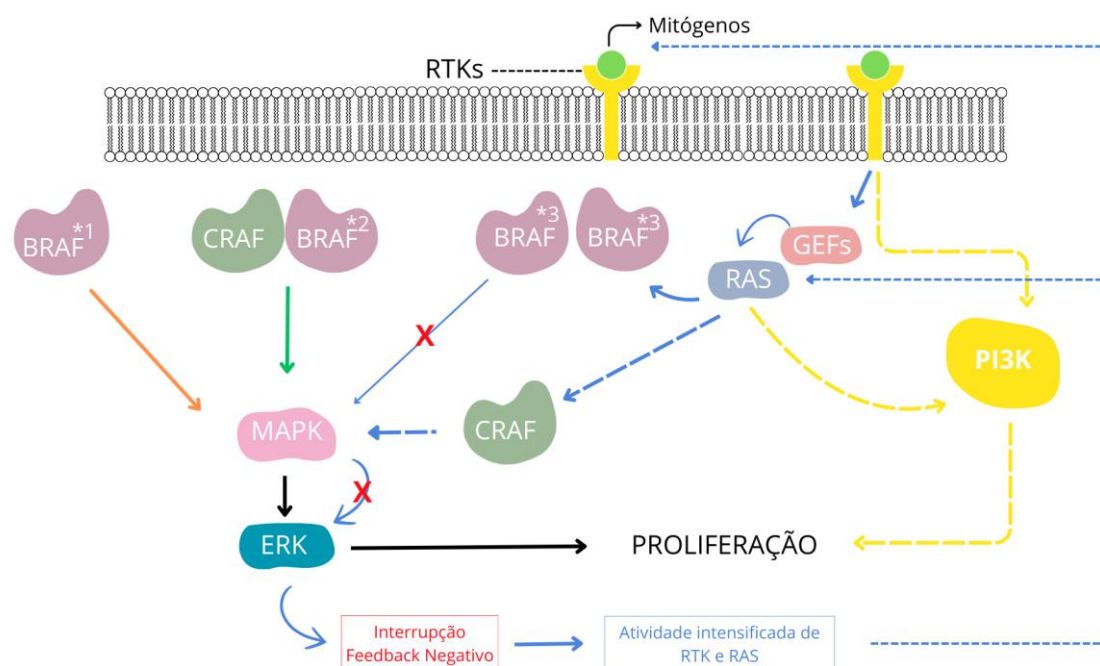
FONTE: Criada pela autora

*BRAF* é um proto-oncogene de interesse clínico, já que se apresenta mutado em 6% de todos os tipos de cânceres humanos (POULIKAKOS; SULLIVAN; YAEGER, 2022). Mais especificamente, em LGSOC, o gene apresenta frequência de até 33% de mutação, sendo um dos genes mais frequentemente alterados nesse tipo de neoplasia (PERRONE, et al., 2024).

As mutações com potencial neoplásico que ocorrem em BRAF são classificadas em mutações de classe 1, 2 e 3. Mutações de classe 1, sendo V600E a mais frequente, gera uma ativação constitutiva da proteína, que funciona como monômero independente da regulação upstream realizada por RAS, resultando na ativação contínua da via MAPK/ERK (ŚMIECH et al., 2020; ZAMAN; WU; BIOVANA, 2019). Mutações BRAF de classe 2 também independem de RAS, mas necessitam da formação de um heterodímero com CRAF, ou BRAF selvagem para ativar MAPK, gerando consequências menos severas comparadas às mutações de classe 1 (ŚMIECH et al., 2020; ZAMAN; WU; BIOVANA, 2019). Já as mutações de classe 3 são caracterizadas pela perda da atividade quinase da proteína, contudo, de forma indireta contribuem com a

proliferação celular devido à redução dos *feedbacks* negativos mediados por ERK (Fig. 25). Essa redução intensifica a atividade de RTK e RAS, que passa a ativar a via a partir de CRAF e, além disso, aciona outras vias de proliferação celular, como PI3K (ÖZGÜ et al., 2024; ŚMIECH et al., 2020; ZAMAN; WU; BIOVANA, 2019).

Figura 25. Ativação atípica da via MAPK/ERK e PI3K



Na ilustração pode-se visualizar a ativação da via MAPK-ERK por mutações BRAF de classe 1 (seta laranja), mutações BRAF de classe 2 (seta verde) e mutações BRAF de classe 3 (representada em ordem por setas diretas azuis, seta tracejada em azul e setas tracejadas em amarelo).

FONTE: Criada pela autora

A falta de *feedback* negativo é um problema que também afeta a terapia com inibidores de RAF, amplamente utilizada em pacientes portadores de mutação de classe 1, sendo a principal causa de resistência primária. A inibição da oncoproteína BRAF pode ativar RAF selvagens, que dão sequência a cascata de sinalização, mas amenizam os mecanismos de *feedback* negativo, causando um aumento no nível de RTKs, RAS-GTP (HOLDERFIELD et al., 2014).

Além da resistência primária, mecanismos de resistência adquirida também são relatados em pacientes de melanoma com mutação em BRAF tratados com inibidores de RAF. Em sua maioria os mecanismos envolvem a reativação de MAPK, seja por ativação mutacional de RAS e/ou MAPK ou ainda pelo aumento de atividade de CRAF (ÖZGÜ et al., 2024;

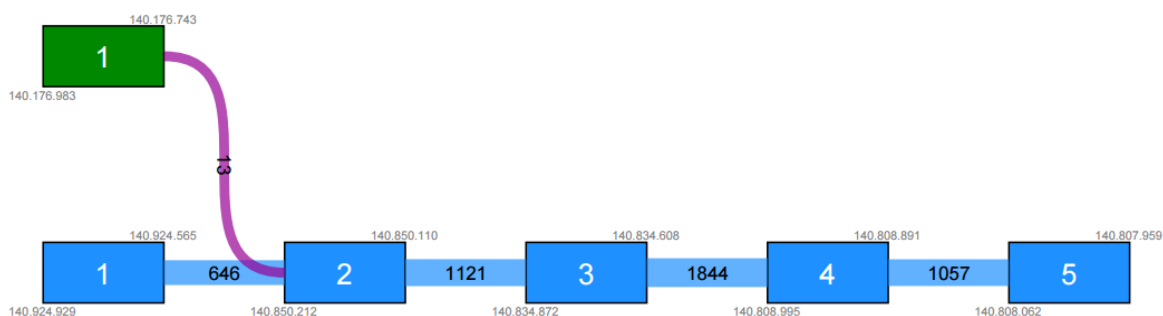
HOLDERFIELD et al., 2014). Ademais, SHI e colaboradores (2014), identificaram uma ativação positiva na via PTEN-PI3K-AKT em cerca de 22% dos pacientes com melanoma tratados com inibidores de RAF. O mesmo foi visto em pacientes com câncer colorretal que realizaram tratamento com anti-EGFR e inibidor de MEK (VITIELLO, et al., 2019)

A paciente POC65, portadora da fusão *BRAF-TMEM178* não apresenta outras mutações em *BRAF*, exceto por uma mutação sinônima, NM\_004333.6(*BRAF*):c.1929A>G (p.Gly643=), classificada como benigna. Contudo, com base no exposto, é evidente que a fusão gênica pode contribuir para a carcinogênese ovariana. Isso ocorre porque, com a perda de seus domínios funcionais, a proteína gerada a partir desse alelo perde sua função quinase. Além disso, considerando sua alta frequência de 33% pode-se sugerir que essa fusão seja um possível *driver* do carcinoma da paciente. A fusão pode ter interferido na homeostase celular, impactando negativamente no *feedback* negativo da via ERK e promovendo a proliferação celular por mecanismos a jusantes.

### 3.1.3 Fusão *KDM7A-BRAF*

A fusão *KDM7A-BRAF* (*p-value* 0,00; *Z-score* 4,16), presente na paciente diagnosticada com HGSOC (PCO37), envolve o gene *KDM7A* na extremidade 5' e o gene *BRAF* na extremidade 3' (Fig. 26). Ambos os genes situam-se em 7q34, ambos na fita -, distantes 500 kb um do outro. Os transcritos de referência para a fusão são: NM\_030647.2 para o gene *KDM7A*, do nucleotídeo 1 ao 240, e NM\_004333.6 para o gene *BRAF*, do nucleotídeo 365 ao 6.459. A fusão é apoiada por 13 *reads* de suporte, representando aproximadamente 2% dos transcritos identificados para o gene *BRAF*.

Figura 26. Fusão Gênica *KDM7A-BRAF*

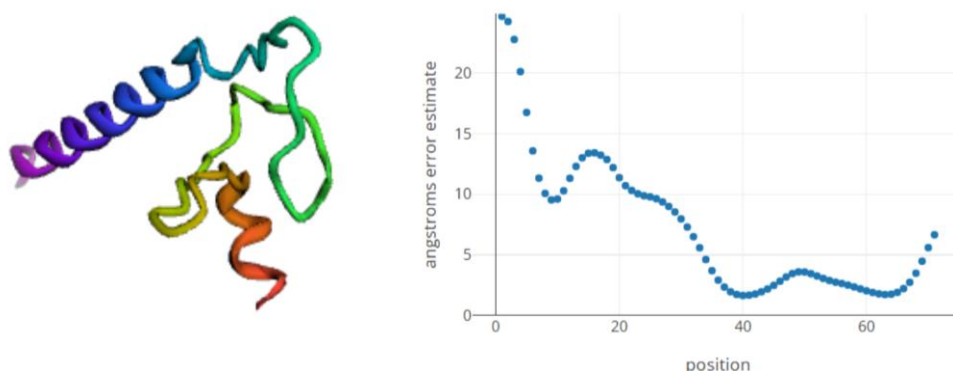


A fusão *KDM7A-BRAF* ocorre entre o exon 1 do gene *KDM7A* na extremidade 5' e o exon 2 do gene *BRAF* na extremidade 3'.

FONTE: CLC Genomics Workbench 23

A fusão resulta em uma proteína com 71 resíduos de aminoácidos, dos quais os 64 iniciais são homólogos aos da proteína *KDM7A*, e os 7 demais derivam da sequência de do gene *BRAF*. No entanto, os 7 aminoácidos diferem da proteína *BRAF* devido à mudança no quadro de leitura gerada pela fusão. Nenhum domínio funcional referente à proteína *KDM7A* foi conservado, e não foi identificada homologia para o fragmento restante e não foi identificada homologia para o fragmento restante. A predição da estrutura 3D da proteína está representada na Figura 27.

Figura 27. Predição da estrutura 3D da proteína quimérica *KDM7A-BRAF*



Predição 3D proteína *KDM7A-BRAF* e sua estimativa de erro em Ångströms ao longo da sequência proteica, indicando a confiança na predição estrutural por resíduo.

FONTE: Adaptado de Robetta

A fusão *KDM7A-BRAF* já foi descrita na literatura, ocorrendo no câncer de ovário seroso de alto grau, embora sem detalhes específicos sobre sua estrutura (ROSS et al., 2016). Além disso, uma fusão envolvendo os mesmos genes foi detectada em células *SNU-16*, que são resistentes a inibidores de *FGFR* (*AZD-R*). Nesse contexto, a fusão envolve o exon 12 de *KDM7A* e, a partir do exon 4 de *BRAF*, resultando na perda do domínio *Ras* em *BRAF* e levando à sua ativação constitutiva dependente de dímero. Essa característica sugere que a fusão pode atuar como um possível mecanismo de resistência ao tratamento com inibidores de *FGFR* (SASE et al., 2018).

Uma possível consequência funcional da fusão detectada e descrita no presente estudo é a inativação de ambos os genes. As implicações dessa inativação para o gene *BRAF* foram discutidas na seção anterior. Aqui serão abordadas as possíveis consequências funcionais para o gene *KDM7A*.

*KDM7A* pertence à família das histonas lisina desmetilases, responsáveis por modificações pós-traducionais, que promovem a remodelação da cromatina (LI et al., 2023). De forma mais específica, *KDM7A* pertence ao subgrupo da família que contém o domínio *Jumonji C* (*JmjC*). *KDM7A* é responsável pelo processo de desmetilação de H3K9me1/2 e H3K27me1/2 (HUANG et al., 2010). Os substratos H3K9me2 e H3K27me2 atuam como marcações epigenéticas de inibição e sua desmetilação por *KDM7A* promove a descondensação da cromatina, permitindo a ação das acetiltransferases para ativar ou potencializar a transcrição dos genes (LONGBOTHAM; ZHANG; FUJIMORI et al., 2020).

Na literatura, há relatos de que as marcações epigenéticas H3K9me2 e H3K27me2 regulam genes envolvidos em processos de desenvolvimento neural e esquelético, além da diferenciação e migração celular, sendo importantes para o desenvolvimento embrionário, período em que a regulação epigenética desempenha um papel crucial (HUANG et al., 2010; LONGBOTHAM; ZHANG; FUJIMORI, 2020; WANG et al., 2021; YANG et al., 2019).

No contexto da Oncologia, diversos estudos tratam da influência do gene *KDM7A* na carcinogênese em diferentes tipos de tumores. Zhang e colaboradores (2021) confirmaram que a desmetilação conjunta de H3K9me2 e H3K27me2, induzida por *KDM7A*, leva à transcrição de *RHOJ*, uma proteína da superfamília das *GTPases Ras*, promovendo migração e invasão de células de câncer de mama *in vitro*. O *knockdown* de *KDM7A* atenuou o crescimento e a metástase de células de câncer de mama em camundongos. Ainda no câncer de mama, *KDM7A*

medeia a transição epitelial-mesenquimal induzida por *TGF- $\beta$*  (LIU et al., 2019). Também em camundongos, *KDM7A* foi associado ao crescimento de células cancerígenas no câncer de bexiga, sendo que o *knockdown* do gene reduziu a proliferação celular neoplásica (LEE et al., 2020).

Por outro lado, em câncer de pâncreas e glioblastoma, por exemplo, a regulação negativa de *KDM7A* confere vantagens às células cancerígenas. No câncer de pâncreas, a redução da expressão de *KDM7A* induz transição epitélio-mesenquimal em células *PANC-1*, promovendo a progressão tumoral (PAN et al., 2015). No glioblastoma, a diminuição da atividade de *KDM7A* resulta no aumento dos níveis de H3K9me3 e H3K27me3, o que induz danos ao *DNA* e impacta a progressão do tumor (MALLM et al., 2020). Já no carcinoma hepatocelular, a expressão reduzida de *KDM7A* está associada a menor sobrevida global dos pacientes (QU et al., 2022).

Diante do exposto, a fusão *KDM7A-BRAF* pode desempenhar um papel significativo na carcinogênese ao comprometer vias de sinalização essenciais para a proliferação celular, um efeito já observado em outras fusões envolvendo *BRAF*. Além disso, a inativação de *KDM7A* pode impactar diretamente a regulação epigenética, alterando a acessibilidade da cromatina e modulando a expressão gênica de maneira dependente do contexto celular. Vale ressaltar que a regulação negativa ou a inativação de *KDM7A* pode ter consequências tanto benéficas quanto prejudiciais, variando conforme o microambiente tumoral e outros fatores biológicos. Diante dessas complexidades, a definição do impacto funcional da fusão *KDM7A-BRAF* demanda investigações mais aprofundadas, incluindo estudos *in vitro*, para esclarecer seu papel na progressão tumoral e na resposta terapêutica.

### 3.2 Validação das fusões

Com o propósito de validar os dados obtidos por RNA-seq e análises bioinformáticas, realizou-se uma etapa de busca das fusões gênicas diretamente no mRNA extraído das pacientes. A validação fornece evidências experimentais independentes que confirmam a existência dos eventos identificados, assegurando a consistência dos resultados e fortalecendo sua relevância no contexto da carcinogênese.

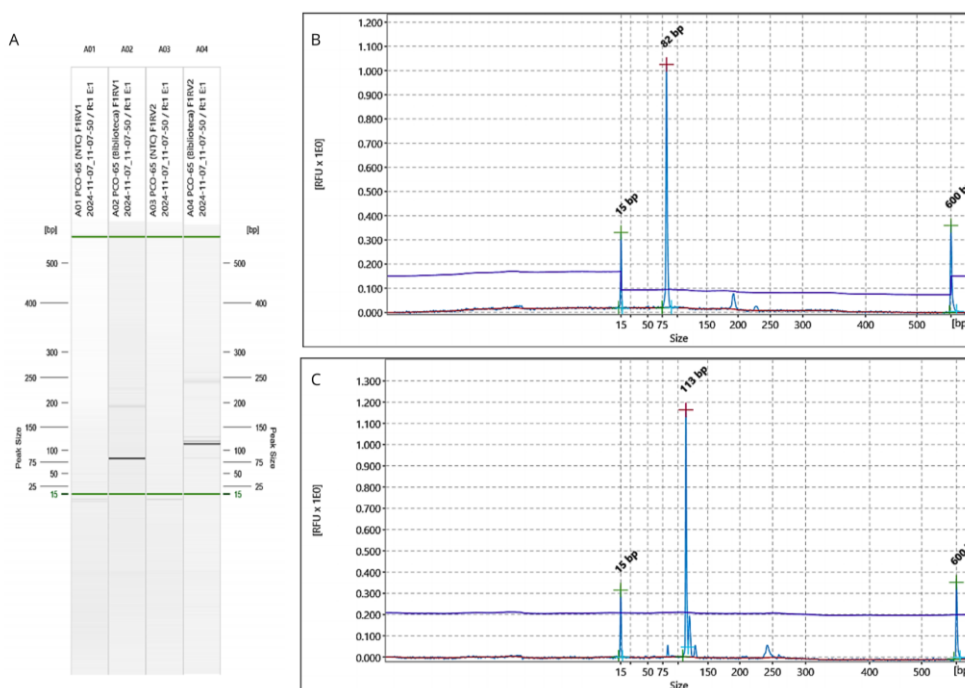
Iniciou-se a validação por meio de PCR convencional, utilizando conjuntos de primers específicos para as fusões identificadas. Foram realizadas diversas tentativas de amplificação para todas as fusões, variando tanto concentração de cDNA quanto temperatura de anelamento.

No entanto, apenas o padrão de peso molecular e o *amplicon* referente aos *primers* para controle da reação foram visualizados no gel de agarose, sem a detecção das fusões esperadas em nenhum dos experimentos (dados não mostrados). Considerando os possíveis fatores limitantes, concluiu-se que, devido à degradação do RNA proveniente de FFPE, um amplicon de aproximadamente 300 pb não seria ideal. Além disso, durante o preparo da biblioteca de sequenciamento, ocorre uma etapa de fragmentação do RNA, gerando fragmentos de aproximadamente 150 pb, o que impossibilitou a testagem dos primers por meio de PCR utilizando amostra das bibliotecas.

Na tentativa de aumentar a sensibilidade da detecção optou-se por realizar uma PCR *hemi-nested*. Contudo, devido a falta de tempo hábil, a técnica foi aplicada apenas para fusão *BRCA1-VAT1*, detectada na paciente PCO65. Essa fusão foi escolhida por envolver um gene supressor tumoral e, além disso, por preservar quase todos os seus domínios funcionais, sendo, portanto, a que apresentava maior potencial para estudos funcionais entre as fusões detectadas.

Com os primers desenhados para a PCR *hemi-nested*, que amplificam amplicons menores que 150 pb, tamanho dos fragmentos gerados na etapa de fragmentação das bibliotecas, foi possível utilizar a biblioteca de sequenciamento da paciente PCO65 como amostra para a testagem dos primers. Para esse fim, realizou-se uma PCR convencional, na qual a fusão *BRCA1-VAT1* foi detectada. Observou-se a presença de amplicons com tamanhos próximos aos esperados, 82 e 113 pb (Figura 28). Durante o seu preparo, a biblioteca de sequenciamento passa por uma etapa de enriquecimento de alvos, o que pode ter contribuído para a amplificação bem-sucedida.

Figura 28. Amplificação do alvo para a fusão BRCA1-VAT1 na biblioteca de sequenciamento

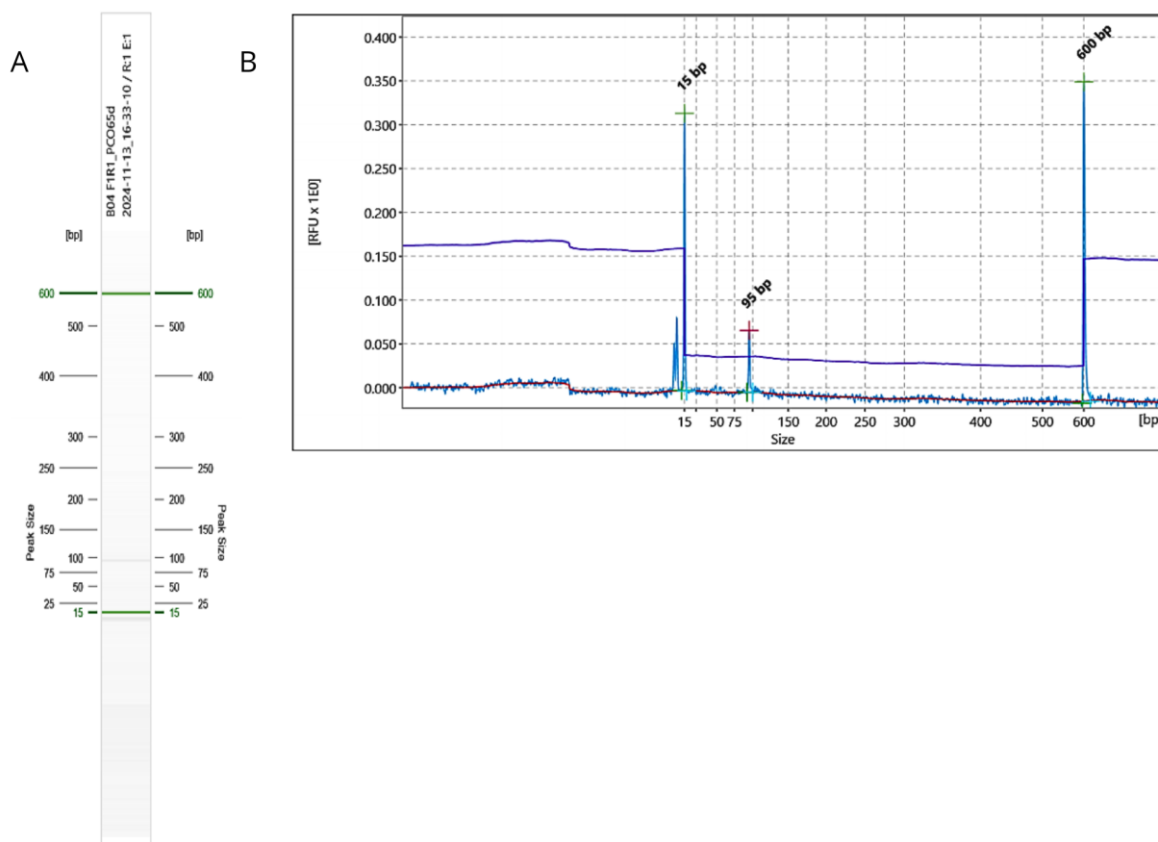


A) Gel virtual da corrida mostrando em sequência controle sem template (NTC) para o conjunto de primers F1R1, primer F1R1, NTC para primer F1R2 e primer F1R2; B) Eletroferograma mostrando amplificação para fragmento de 95 pb (alvo do primer F1R1); C) Eletroferograma mostrando amplificação para fragmento de 113pb (alvo do primer F1R2).

FONTE: Adaptada pela autora de QIAxcel

Na primeira etapa da *hemi-nested*, realizada na amostra de RNA extraída do tecido tumoral parafinado da paciente PCO65, não foi possível visualizar a presença do amplicon alvo (114 pb, primers F1 vs. R2) na eletroforese capilar. Esse resultado negativo pode ser atribuído à degradação do RNA proveniente de amostras FFPE, um fator comum em materiais fixados dessa forma (CAPPELLO et al., 2022). Ademais, o alvo de interesse apresenta baixa frequência (1,54%), o que reduz ainda mais as chances de detecção. Apesar disso, utilizou-se o produto da primeira etapa da PCR *hemi-nested* para a segunda etapa da reação, onde houve a detecção de um fragmento de 95 pb, enquanto o tamanho esperado era de 83 pb (primers F1 vs. R2; Figura 29).

Figura 29. Amplificação do alvo para a fusão BRCA1-VAT1 por PCR *hemi-nested*



A) Gel virtual da corrida mostrando amplicon de 95pb; B) Eletroferograma mostrando amplificação do fragmento de 95pb. O padrão de peso molecular utilizado foi de 25 a 500pb.

FONTE: Adaptada pela autora de QIAxcel

Após a purificação do amplicon de 95pb, amplificado na amostra de tecido tumoral, o produto foi enviado para sequenciamento Sanger. No entanto, os resultados foram insatisfatórios, apresentando uma sequência de baixa qualidade e confiabilidade. Logo, não foi possível determinar que o fragmento detectado era derivado da fusão *BRCA1-VAT1*.

A detecção das fusões gênicas realizadas a partir da técnica de alta sensibilidade, RNA-seq, oferecem uma base promissora para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à carcinogênese. Embora os esforços para a validação tenham enfrentado desafios, os resultados preliminares apontam para a relevância dessas fusões.

### 3.3 Relação entre as Fusões Gênicas e Perfis Clínico-Patológicos das pacientes com CO

#### 3.3.1 A paciente PCO65

A paciente PCO65, 51 anos, em sua história gineco-obstétrica refere menarca aos 13 anos, não

apresentava menopausa ao diagnóstico, três gestações e três partos normais. Possui histórico de comorbidades, incluindo aneurisma cerebral, depressão e trombose; além de histórico familiar de câncer de mama (mãe) e câncer de fígado e intestino (pai). Foi diagnosticada com câncer de colo uterino aos 39 anos de idade, tratada com cirurgia de alta frequência. Sete anos depois, aos 46 anos, foi diagnosticada com LGSOC, no estágio IA. Laudo anatomopatológico de cortes histológicos seriados mostram margens livres sem invasão linfovascular. Apresentava CA-125 de 8052 U/mL. O tumor estava limitado ao ovário direito, sem presença de células malignas na ascite. De forma síncrona, também foi diagnosticada com outro adenocarcinoma de colo uterino em estágio IB1. Inicialmente, a paciente foi submetida a salpingo-ooforectomia bilateral, histerectomia total abdominal, omentectomia e linfadenectomia pélvica seletiva bilateral, sem tratamento adjuvante para o câncer de ovário. Além disso, após cirurgia passou por radioterapia conformacional loco-regional em pelve, na dose tumor total de 45Gy/25 frações e 4 inserções de braquiterapia T para tratar câncer de colo de útero. Quase um ano após a cirurgia, teve a primeira recidiva de adenocarcinoma de ovário sendo tratada com seis ciclos de quimioterapia (carboplatina + paclitaxel), obtendo remissão completa. Diante do quadro sintomatológico, um ano depois, foram solicitados novos exames para estadiamento de novas recidivas. Atualmente, a doença se encontra estável no abdômen, com sinais de metástase no pulmão e a paciente está em cuidados paliativos, fazendo uso de gencitabina.

A paciente apresenta um histórico complexo de neoplasias ginecológicas, incluindo carcinoma do colo do útero e LGSC, ambos diagnosticados em estágios iniciais e tratados cirurgicamente. Apesar do tratamento inicial bem-sucedido, incluindo cirurgia e radioterapia, houve múltiplas recidivas do adenocarcinoma de ovário, evoluindo para metástases pulmonares. Este caso ilustra a complexidade da evolução do LGSC, sua tendência a recidivar e a importância de estratégias terapêuticas individualizadas para o manejo da doença avançada. As fusões *BRCA1-VAT1* detectadas nesta paciente, devido sua baixa frequência (presente apenas, em aproximadamente 1,54% dos transcritos referentes ao BRCA1), e a possível indução de NMD pode não ter repercussão funcional. Contudo, a maior parte do gene BRCA1 está preservada, havendo truncamento do domínio BRCT-c. As análises das interações entre a proteína de fusão e seus ligandos habituais sugerem que estas interações podem continuar ocorrendo ou ser modificadas. Devido a função dos ligantes quando em complexo com os domínios *in tandem* BRCT\_BRCA1, prejudicados pela fusão, tais alterações podem comprometer a capacidade de reparo do DNA por meio de diferentes mecanismos, impedir a degradação de células danificadas e favorecer a síntese de lipídios, contribuindo com atividades

metabólicas associadas ao aumento de demanda energética. Esses distúrbios têm potencial para afetar a resposta à quimioterapia e contribuir para a recorrência do tumor. Adicionalmente, a inativação de BRAF, na fusão BRAF-TMEM178B, pode influenciar negativamente o *feedback* negativo da via ERK promovendo a proliferação celular e recidiva da doença. Esta fusão ocorre em uma frequência relevante (aproximadamente 32%), destacando sua possível contribuição para o câncer já estabelecido.

### 3.3.2 A paciente PCO 37

A paciente PCO037, diagnosticada aos 54 anos, apresentava carcinoma seroso papilífero de alto grau, com estadiamento IVB. Possuía histórico ginecológico de menarca aos 14 anos e menarca aos 54, não tendo nenhuma gestação e histórico familiar de câncer de mama e ovário na mãe e câncer de próstata no pai. Não apresentava comorbidades prévias conhecidas, mas possuía histórico de tabagismo. O diagnóstico foi confirmado por exame anatomopatológico, que revelou margens cirúrgicas comprometidas e presença de invasão linfovascular, sem relato de ascite. O nível de CA 125 antes da cirurgia era de 574,3 U/mL. Como tratamento primário, a paciente foi submetida a laparotomia exploradora, com hysterectomia total, anexectomia bilateral e omentectomia. Iniciou quimioterapia com cisplatina e taxol, porém o tumor demonstrou resistência, com recidiva apenas um mês do término dos ciclos de tratamento. A paciente seguiu para quimioterapia de segunda linha com gemcitabina. No entanto, no mesmo ano, os exames de imagem indicaram metástases pulmonares e hepáticas. A paciente permaneceu em acompanhamento paliativos devido à progressão da doença, evoluindo para óbito em dezembro do mesmo ano.

Como discutido anteriormente, a fusão *KDM7A-BRAF* pode contribuir para a carcinogênese ovariana, comprometendo vias de sinalização essenciais para a proliferação celular. Além disso, sua presença pode influenciar na condensação da cromatina, modulando a expressão gênica de forma dependente do contexto celular. Esta fusão foi detectada na paciente diagnosticada já em estágios avançados, ocorrendo em baixa frequência (2%) sugerindo que, a princípio, ela não deve ser um fator determinante para o desenvolvimento do tumor. No entanto, diante de seu papel relevante no contexto da carcinogênese, a fusão *KDM7A-BRAF* pode influenciar a progressão da doença.

#### 4. CONCLUSÕES

As análises realizadas no presente estudo indicam que as fusões *BRCA1-VAT1*, *BRAF-TMEM178B* e *KDM7A-BRAF*, que envolvem oncogenes e supressores tumorais, podem contribuir para a carcinogênese ovariana ao afetarem a homeostase celular e a integridade de importantes complexos funcionais. Os mecanismos envolvidos incluem a alteração dos processos de degradação de células danificadas, o aumento do arcabouço lipídico, a inibição do reparo do DNA, a proliferação celular exacerbada e a modulação da expressão gênica por meio da regulação epigenética. Essas perturbações podem favorecer o desenvolvimento e a progressão da neoplasia, além de influenciar nas respostas aos tratamentos. Dessa forma, este estudo reforça a importância de investigações que busquem compreender o impacto desses eventos e suas potenciais implicações clínicas, destacando a relevância das fusões gênicas na biologia do câncer epitelial de ovário.

#### 5. LIMITAÇÕES

Embora este estudo tenha fornecido observações relevantes sobre o impacto das fusões abordadas, sua análise foi limitada pelo número reduzido de amostras, o que dificulta a correlação direta entre os achados e os aspectos clínico-patológicos das pacientes. Além disso, a abordagem *in silico* apresenta restrições inerentes às predições computacionais, que não reproduzem integralmente o contexto celular nem capturam a complexidade das interações gênicas em sua totalidade.

#### 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo contribui para a compreensão das alterações moleculares associadas à carcinogênese ovariana. Estudos futuros, incluindo análises funcionais *in vitro* e *in vivo*, poderão complementar a investigação dos impactos dessas fusões gênicas, bem como suas implicações no prognóstico e na resposta terapêutica das pacientes.

## 7. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS E BIBLIOGRÁFICAS

CLC Genomics Workbench 23.0. Disponível em: <https://digitalinsights.qiagen.com/> Acesso em: fev. 2025

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. O que é câncer. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: fev. 2025.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Cancer TODAY. Globocan 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int>. Acesso em: out. 2024.

MCINNES, Roderick R. Thompson & Thompson Genética Médica. 8. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2016. E-book. p.309. ISBN 9788595151819. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595151819/> . Acesso em: jan. 2025.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.) World cancer report: cancer research for cancer prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: [IARC Publications Website - World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention](https://www.iarc.who.int/publications-newspapers/) Acesso em: Jan. 2025.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol, n. 215, p. 403-410. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

BRUNO, Rossella; FONTANINI, Gabriella. Next generation sequencing for gene fusion analysis in lung cancer: a literature review. Diagnostics, v. 10, n. 8, p. 521, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10080521>

BRUSSELMANS, Koen et al. RNA interference–mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase- $\alpha$  gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. Cancer research, v. 65, n. 15, p. 6719-6725, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0571>

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. Nature, v. 474, n. 7353, p. 609, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature10166>

CANTOR, Sharon B. et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. Cell, v. 105, n. 1, p. 149-160, 2001. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00304-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00304-X)

CAPPELLO, Filippo et al. FFPE-based NGS approaches into clinical practice: the limits of glory from a pathologist viewpoint. Journal of Personalized Medicine, v. 12, n. 5, p. 750, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.labinv.2022.100027>

CASTILLO, Andy et al. The BRCA1-interacting protein Abraxas is required for genomic stability and tumor suppression. Cell reports, v. 8, n. 3, p. 807-817, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.050>

CHATURVEDI, Shobhit S. et al. Structure-function relationships in KDM7 histone

demethylases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, v. 117, p. 113-125, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.08.005>

CHEN, Longchuan et al. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1· CtIP· MRN is important for DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 12, p. 7713-7720, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M710245200>

CHEN, Zhang-Hui et al. Man2a1–fer fusion gene is expressed by human liver and other tumor types and has oncogenic activity in mice. *Gastroenterology*, v. 153, n. 4, p. 1120-1132. e15, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.036>

CHRISTOU, Charita M.; KYRIACOU, Kyriacos. BRCA1 and its network of interacting partners. *Biology*, v. 2, n. 1, p. 40-63, 2012. Doi: <https://doi.org/10.3390/biology2010040>

CLAPPERTON, Julie A. et al. Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer. *Nature structural & molecular biology*, v. 11, n. 6, p. 512-518, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb775>

EARP, Madalene A. et al. Characterization of fusion genes in common and rare epithelial ovarian cancer histologic subtypes. *Oncotarget*, v. 8, n. 29, p. 46891, 2017. Doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16781>

EFANOV, Alexey A. et al. Investigation of the relationship between radiation dose and gene mutations and fusions in post-Chernobyl thyroid cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 110, n. 4, p. 371-378, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/djx209>

FARMER, Hannah et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, v. 434, n. 7035, p. 917-921, 2005. <https://doi.org/10.1038/nature03445>

FERNANDEZ, Luna, J. L. Bcr-Abl and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Apoptosis*, v. 5, p. 315-318, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1009623222534>

FRIEDENREICH, Christine M.; RYDER-BURBIDGE, Charlotte; MCNEIL, Jessica. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular oncology*, v. 15, n. 3, p. 790-800, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12772>

GASTEIGER, Elisabeth et al. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. *Humana press*, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:57>

GOFF, Barbara A. et al. How are symptoms of ovarian cancer managed? A study of primary care physicians. *Cancer*, v. 117, n. 19, p. 4414-4423, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1002/ncr.26035>

HANAFUSA, Hiroshi et al. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature cell biology*, v. 4, n. 11, p. 850-858, 2002. Doi: <https://doi.org/10.1038/ncb867>

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. *cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

HATZIVASSILIOU, Georgia et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*, v. 464, n. 7287, p. 431-435, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature08833>

HEIDORN, Sonja J. et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*, v. 140, n. 2, p. 209-221, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.040>

HOLDERFIELD, Matthew et al. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Reviews Cancer*, v. 14, n. 7, p. 455-467, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3760>

HORIUCHI, Takayuki; AIGAKI, Toshiro. Alternative trans-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biology of the Cell*, v. 98, n. 2, p. 135-140, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1042/BC20050002>

HUANG, Chengyang et al. Dual-specificity histone demethylase KIAA1718 (KDM7A) regulates neural differentiation through FGF4. *Cell research*, v. 20, n. 2, p. 154-165, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1038/cr.2010.5>

KIMMELMAN, A.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Robetta: Automated structure prediction for protein biology. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. W526-W531, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gki327>

KURMAN, Robert J.; SHIH, Ie-Ming. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *The American journal of pathology*, v. 186, n. 4, p. 733-747, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.011>

LEE, Kyoung-Hwa et al. Histone demethylase KDM7A regulates androgen receptor activity, and its chemical inhibitor TC-E 5002 overcomes cisplatin-resistance in bladder cancer cells. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 16, p. 5658, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21165658>

LEUNG, Charles Chung Yun; GLOVER, JN Mark. BRCT domains: easy as one, two, three. *Cell cycle*, v. 10, n. 15, p. 2461-2470, 2011. Doi: <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16312>

LHEUREUX, Stephanie; BRAUNSTEIN, Marsela; OZA, Amit M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 69, n. 4, p. 280-304, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21559>

LI, Chang-Yun et al. Lysine-specific demethylase 7A (KDM7A): A potential target for disease therapy. *Biochemical Pharmacology*, p. 115799, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115799>

LI, Shang et al. Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n.

16, p. 11334-11338, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.11334>

LI, Shang et al. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature*, v. 406, n. 6792, p. 210-215, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1038/35018134>

LIU, Qi et al. Identification of novel TGF- $\beta$  regulated genes with pro-migratory roles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1865, n. 12, p. 165537, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165537>

LIU, Qi et al. Identification of novel TGF- $\beta$  regulated genes with pro-migratory roles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1865, n. 12, p. 165537, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21165658>

LONGBOTHAM, James E.; ZHANG, Meng Yao; FUJIMORI, Danica Galonić. Domain cross-talk in regulation of histone modifications: molecular mechanisms and targeting opportunities. *Current opinion in chemical biology*, v. 57, p. 105-113, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.06.001>

LU, Bingfeng et al. Fusion genes in gynecologic tumors: the occurrence, molecular mechanism and prospect for therapy. *Cell Death & Disease*, v. 12, n. 8, p. 783, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04065-0>

MADEIRA, F., PEARCE, M., TIVEY, A.R.N. et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res*, v. 240, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>.

MAGNARD, Clemence et al. BRCA1 interacts with acetyl-CoA carboxylase through its tandem of BRCT domains. *Oncogene*, v. 21, n. 44, p. 6729-6739, 2002. Doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205915>

MALLM, Jan-Philipp et al. Glioblastoma initiating cells are sensitive to histone demethylase inhibition due to epigenetic deregulation. *International Journal of Cancer*, v. 146, n. 5, p. 1281-1292, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.32649>

MERTENS, Fredrik et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 15, n. 6, p. 371-381, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3947>

MOREAU, Karen et al. BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 6, p. 3172-3181, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M504652200>

NEEL, Benjamin G. et al. Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell*, v. 23, n. 2, p. 323-334, 1981. Doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90128-8)

ORR, Brian; EDWARDS, Robert P. Diagnosis and treatment of ovarian cancer. *Hematology/Oncology Clinics*, v. 32, n. 6, p. 943-964, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.07.010>

ÖZGÜ, Eylül et al. Therapeutic vulnerabilities and pan-cancer landscape of BRAF class III mutations in epithelial solid tumors. *BJC reports*, v. 2, n. 1, p. 77, 2024. Doi:

<https://doi.org/10.1038/s44276-024-00086-2>

PAN, Mei-Ren et al. G9a orchestrates PCL3 and KDM7A to promote histone H3K27 methylation. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, p. 18709, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep18709>

PEÑA-GUERRERO, José et al. BRCT Domains: Structure, Functions, and Implications in Disease—New Therapeutic Targets for Innovative Drug Discovery against Infections. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 7, p. 1839, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071839>

PERRONE, Chiara et al. Targeting BRAF pathway in low-grade serous ovarian cancer. *Journal of Gynecologic Oncology*, v. 35, n. 4, p. e104, 2024. Doi: [10.3802/jgo.2024.35.e104](https://doi.org/10.3802/jgo.2024.35.e104)

POULIKAKOS, Poulikos I.; SULLIVAN, Ryan J.; YAEGER, Rona. Molecular pathways and mechanisms of BRAF in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, v. 28, n. 21, p. 4618-4628, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2138>

QU, Li-Hua et al. Comprehensive analyses of prognostic biomarkers and immune infiltrates among histone lysine demethylases (KDMs) in hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 71, n. 10, p. 2449-2467, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03167-8>

QUINTÁS-CARDAMA, Alfonso; CORTES, Jorge. Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 113, n. 8, p. 1619-1630, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144790>

RODRIGUEZ, Maria et al. Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 52, p. 52914-52918, Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.C300407200>

ROSS, Jeffrey S. et al. The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *International journal of cancer*, v. 138, n. 4, p. 881-890, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.29825>

ROSS, Jeffrey S. et al. The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *International journal of cancer*, v. 138, n. 4, p. 881-890, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.29825>

SANTOS, Marcella et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, 2023. Doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>

SASE, Hitoshi et al. Acquired JHDM1D–BRAF fusion confers resistance to FGFR inhibition in FGFR2-amplified gastric cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 17, n. 10, p. 2217-2225, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-17-1022>

SHAKYA, Reena et al. BRCA1 tumor suppression depends on BRCT phosphoprotein binding, but not its E3 ligase activity. *Science*, v. 334, n. 6055, p. 525-528, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1209909>

SHEN, Yang; TONG, Liang. Structural evidence for direct interactions between the BRCT

domains of human BRCA1 and a phospho-peptide from human ACC1. *Biochemistry*, v. 47, n. 21, p. 5767-5773, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1021/bi800314m>

SHENG, Zi-Zhang; ZHAO, Yu-Qi; HUANG, Jing-Fei. Functional evolution of BRCT domains from binding DNA to protein. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 7, p. EBO. S7084, 2011. Doi: <https://doi.org/10.4137/EBO.S7084>

SHI, HUBING et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer discovery*, v. 4, n. 1, p. 80-93, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0642>

SHIOZAKI, Eric N. et al. Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: implications for signaling. *Molecular cell*, v. 14, n. 3, p. 405-412, 2004. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00238-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00238-2)

ŚMIECH, Magdalena et al. Emerging BRAF mutations in cancer progression and their possible effects on transcriptional networks. *Genes*, v. 11, n. 11, p. 1342, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/genes11111342>

STELZER, G.; DANNEMANN, M.; JAIN, M.; et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 54, p. 1.30.1-1.30.33, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>

TACHON, Gaëlle et al. Targeted RNA-sequencing assays: a step forward compared to FISH and IHC techniques?. *Cancer medicine*, v. 8, n. 18, p. 7556-7566, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1002/cam4.2599>.

THUMULURI, Vineet et al. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic acids research*, v. 50, n. W1, p. W228-W234, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac278>

TORRE, Lindsey A. et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 4, p. 284-296, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21456>

UNTERGASSER, Andreas et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

VITIELLO, P.P., CARDONE, C., MARTINI, G. *et al.* Receptor tyrosine kinase-dependent PI3K activation is an escape mechanism to vertical suppression of the EGFR/RAS/MAPK pathway in KRAS-mutated human colorectal cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 41 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1035-0>

WAN, Paul TC et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, v. 116, n. 6, p. 855-867, 2004. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00215-6)

WANG, Jiyao et al. The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D384-D388, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>

WANG, Peng et al. Hydroxysafflor yellow A promotes osteogenesis and bone development via epigenetically regulating  $\beta$ -catenin and prevents ovariectomy-induced bone loss. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 137, p. 106033, 2021. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106033>

WELLBROCK, Claudia; KARASARIDES, Maria; MARAIS, Richard. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 5, n. 11, p. 875-885, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrm1498>

WILLIAMS, R. Scott et al. Detection of protein folding defects caused by BRCA1-BRCT truncation and missense mutations. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 52, p. 53007-53016, 2003. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M310182200>

WILLIAMS, R. Scott et al. Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1. *Nature structural & molecular biology*, v. 11, n. 6, p. 519-525, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb776>

YANG, Xiaoyue et al. Histone demethylase KDM7A reciprocally regulates adipogenic and osteogenic differentiation via regulation of C/EBP $\alpha$  and canonical Wnt signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 23, n. 3, p. 2149-2162, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1111/jcmm.14126>

YAO, Zhan et al. BRAF mutants evade ERK-dependent feedback by different mechanisms that determine their sensitivity to pharmacologic inhibition. *Cancer cell*, v. 28, n. 3, p. 370-383, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.08.001>

YU, Xiaochun; CHEN, Junjie. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and cellular biology*, v. 24, n. 21, p. 9478-9486, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9478-9486.2004>

ZAMAN, Aubhishek; WU, Wei; BIVONA, Trevor G. Targeting oncogenic BRAF: past, present, and future. *Cancers*, v. 11, n. 8, p. 1197, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/cancers11081197>

ZHANG, Xiaodong et al. Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *The EMBO journal*, 1998. Doi: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6404>

ZHANG, Ziyu et al. Corrigendum: The Jumonji Domain-Containing Histone Demethylase Homolog 1D/lysine Demethylase 7A (JHDM1D/KDM7A) Is an Epigenetic Activator of RHOJ Transcription in Breast Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 729416, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664375>

ZHU, J.W., CHARKHCHI, P. & AKBARI, M.R. Potential clinical utility of liquid biopsies in ovarian cancer. *Mol Cancer* 21, 114 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01588-8>

**APÊNDICE A - Sequências do mRNA; CDS e tradução para a fusão *BRCA1-VATI***

>mRNA 7294.3

GTACCTTGATTTTCGTATTCTGAGAGGCTGCTGCTTAGCGGTAGCCCCTTGGTTTCC  
 GTGGCAACGGAAAAGCGCGGGAATTACAGATAAATTA AAACTGCGACTGCGCGG  
 CGTGAGCTCGCTGAGACTTCCTGGACGGGGGACAGGCTGTGGGGTTTCTCAGATA  
 ACTGGGCCCCTGCGCTCAGGAGGCCTTCACCCTCTGCTCTGGGTAAAGTTCATTG  
 GAACAGAAAGAAATGGATTTATCTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGTACAAAATGTCA  
 TTAATGCTATGCAGAAAATCTTAGAGTGTCCCATCTGTCTGGAGTTGATCAAGGA  
 ACCTGTCTCCACAAAGTGTGACCACATATTTTGCAAATTTTGCATGCTGAACTTC  
 TCAACCAGAAGAAAGGGCCTTCACAGTGCCTTTATGTAAGAATGATATAACCAA  
 AAGGAGCCTACAAGAAAGTACGAGATTTAGTCAACTTGTGGAAGAGCTATTGAA  
 AATCATTTGTGCTTTTCAGCTTGACACAGGTTTGGAGTATGCAAACAGCTATAATT  
 TTGCAAAAAAGGAAAATAACTCTCCTGAACATCTAAAAGATGAAGTTTCTATCAT  
 CCAAAGTATGGGCTACAGAAACCGTGCCAAAAGACTTCTACAGAGTGAACCCGA  
 AAATCCTTTCCTTGCAGGAAACCAGTCTCAGTGTCCAACCTCTTAACCTTGGA  
 ACTGTGAGA  
 ACTCTGAGGACAAAGCAGCGGATACAACCTCAAAGACGTCTGTCTAC  
 ATTGAATTGGGATCTGATTCTTCTGAAGATACCGTTAATAAGGCAACTTATTGCA  
 GTGTGGGAGATCAAGAATTGTTACAAATCACCCCTCAAGGAACCAGGGATGAAA  
 TCAGTTTGGATTCTGCAAAAAAGGCTGCTTGTGAATTTTCTGAGACGGATGTAAC  
 AAATACTGAACATCATCAACCCAGTAATAATGATTTGAACACCACTGAGAAGCGT  
 GCAGCTGAGAGGCATCCAGAAAAGTATCAGGGTAGTTCTGTTTCAAACCTTGCATG  
 TGGAGCCATGTGGCACAATACTCATGCCAGCTCATTACAGCATGAGAACAGCA  
 GTTTATTACTCACTAAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAATTCTGTAATAA  
 AAGCAAACAGCCTGGCTTAGCAAGGAGCCAACATAACAGATGGGCTGGAAGTAA  
 GGAAACATGTAATGATAGGCGGACTCCCAGCACAGAAAAAAGGTAGATCTGAA  
 TGCTGATCCCCTGTGTGAGAGAAAAGAATGGAATAAGCAGAAACTGCCATGCTC  
 AGAGAATCCTAGAGATACTGAAGATGTTCCCTTGATAAACTAAATAGCAGCATT  
 CAGAAAGTTAATGAGTGGTTTTCCAGAAGTGATGAACTGTTAGGTTCTGATGACT  
 CACATGATGGGGAGTCTGAATCAAATGCCAAAGTAGCTGATGTATTGGACGTTCT  
 AAATGAGGTAGATGAATATTCTGGTTCTTCAGAGAAAATAGACTTACTGGCCAGT  
 GATCCTCATGAGGCTTTAATATGTA  
 AAAAGTGAAAGAGTTCACTCCAAATCAGTAG  
 AGAGTAATATTGAAGACAAAATATTTGGGAAAACCTATCGGAAGAAGGCAAGCC  
 TCCCCAACTTAAGCCATGTA  
 AACTGAAAATCTAATTATAGGAGCATT  
 TTGTTACTGAGCCACAGATAATA  
 CAAGAGCGTCCCCTCACAAATAAATTA  
 AAGCGTAAAAGGAGACCTACAT  
 CAGGCCTTCATCCTGAGGATTTTAT  
 CAAGAAAGCAGATTTGGCAGTTC  
 AAAAGACTCCTGAAATGATAAAT  
 CAGGGAACTAACCAAACGGAGC  
 AGAATGGTCAAGTGATGAATATT  
 ACTAATAGTGGTCATGAGAATA  
 AAAACAAAAGGTGATTCTATT  
 CAGAATGAGAAAAATCCTAAC  
 CCAATAGAACTCGAAAAAGAAT  
 CTGCTTTCAAAACGAAAGCT  
 GAACCTATAAGCAGCAGTATA  
 AGCAATATGGA  
 ACTCGAATTAAATATCCACA  
 ATTCAAAGCACCTAAAAAGA  
 ATAGGCTGAGGAGGAAGTCT  
 TACCAGGCATATTCATGCGCTT  
 GAACTAGTAGTCAGTAGAAAT  
 CTAAGCCCACCT

AATTGTA CTGAATTGCAAATTGATAGTTGTTCTAGCAGTGAAGAGATAAAGAAAA  
AAAAGTACAACCAAATGCCAGTCAGGCACAGCAGAAACCTACA ACTCATGGAAG  
GTAAAGAACCTGCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAACAAGCCAAATGAACAGACA  
AGTAAAAGACATGACAGCGATACTTTCCAGAGCTGAAGTTAACA AATGCACCT  
GGTTCTTTTACTAAGTGTTCAAATACCAGTGA ACTTAAAGAATTTGTCAATCCTAG  
CCTTCCAAGAGAAGAAAAAGAAGAGAACTAGAAACAGTTAAAGTGTCTAATAA  
TGCTGAAGACCCCAAAGATCTCATGTTAAGTGGAGAAAGGGTTTTGCAA ACTGAA  
AGATCTGTAGAGAGTAGCAGTATTTCA TTGGTACCTGGTACTGATTATGGCACTC  
AGGAAAGTATCTCGTTACTGGAAGTTAGCACTCTAGGGAAGGCCAAAACAGAAC  
CAAATAAATGTGTGAGTCAGTGTGCAGCATT TGAAAACCCCAAGGGACTAATTCA  
TGGTTGTTCCAAAGATAATAGAAATGACACAGAAGGCTTTAAGTATCCATTGGGA  
CATGAAGTTAACCACAGTCGGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGA ACTT  
GATGCTCAGTATTTGCAGAATACATTCAAGGTTTCAAAGCGCCAGTCATTTGCTC  
CGTTTTCAAATCCAGGAAATGCAGAAGAGGAATGTGCAACATTCTCTGCCCACTC  
TGGGTCTTAAAGAAACAAAGTCCAAAAGTCACTTTTGAATGTGAACAAAAGGA  
AGAAAATCAAGGAAAGAATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATAT  
CACTGCAGGCTTTCCTGTGGTTGGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAA  
TGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAGGTTTTGTCTATCATCTCAGTTCAGAGGCAACG  
AAACTGGACTCATTACTCAAATAAACATGGACTTTTACAAAACCCATATCGTAT  
ACCACCACTTTTTCCCATCAAGTCATTTGTTAAACTAAATGTAAGAAAAATCTG  
CTAGAGGAAAACCTTTGAGGAACATTCAATGTCACCTGAAAGAGAAATGGGAAAT  
GAGAACATTCCAAGTACAGTGAGCACAATTAGCCGTAATAACATTAGAGAAAAT  
GTTTTTAAAGAAGCCAGCTCAAGCAATATTAATGAAGTAGGTTCCAGTACTAATG  
AAGTGGGCTCCAGTATTAATGAAATAGGTTCCAGTGATGAAAACATTCAAGCAG  
AACTAGGTAGAAACAGAGGGCCAAAATTGAATGCTATGCTTAGATTAGGGGTTTT  
GCAACCTGAGGTCTATAACAAAGTCTTCCCTGGAAGTAATTGTAAGCATCCTGAA  
ATAAAAAAGCAAGAATATGAAGAAGTAGTTCAGACTGTTAATACAGATTTCTCTC  
CATATCTGATTTTCAGATAACTTAGAACAGCCTATGGGAAGTAGTCATGCATCTCA  
GGTTTGTCTGAGACACCTGATGACCTGTTAGATGATGGTGAAATAAAGGAAGAT  
ACTAGTTTTGCTGAAAATGACATTAAGGAAAGTTCTGCTGTTTTTAGCAAAGCG  
TCCAGAAAGGAGAGCTTAGCAGGAGTCCTAGCCCTTTCACCCATACACATTTGGC  
TCAGGGTTACCGAAGAGGGGCCAAGAAATTAGAGTCCTCAGAAGAGAACTTATC  
TAGTGAGGATGAAGAGCTTCCCTGCTTCCAACACTTGTTATTTGGTAAAGTAAAC  
AATATACCTTCTCAGTCTACTAGGCATAGCACCGTTGCTACCGAGTGTCTGTCTAA  
GAACACAGAGGAGAATTTATTATCATTGAAGAATAGCTTAAATGACTGCAGTAAC  
CAGGTAATATTGGCAAAGGCATCTCAGGAACATCACCTTAGTGAGGAAACAAAA  
TGTTCTGCTAGCTTGTTTTCTTCACAGTGCAGTGAATTGGAAGACTTGACTGCAA  
TACAAACACCCAGGATCCTTTCTTGATTGGTTCTTCAAACAAATGAGGCATCAG  
TCTGAAAGCCAGGGAGTTGGTCTGAGTGACAAGGAATTGGTTTCAGATGATGAA  
GAAAGAGGAACGGGCTTGGAAGAAAATAATCAAGAAGAGCAAAGCATGGATTC  
AACTTAGGTGAAGCAGCATCTGGGTGTGAGAGTGAAACAAGCGTCTCTGAAGA  
CTGCTCAGGGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTTAACCACTCAGCAGAGGGGATACC  
ATGCAACATAACCTGATAAAGCTCCAGCAGGAAATGGCTGAACTAGAAGCTGTG  
TTAGAACAGCATGGGAGCCAGCCTTCTAACAGCTACCCTTCCATCATAAGTGACT

CTTCTGCCCTTGAGGACCTGCGAAATCCAGAACAAAGCACATCAGAAAAAGCAG  
TATTA ACTTCACAGAAAAGTAGTGAATACCCTATAAGCCAGAATCCAGAAGGCCT  
TTCTGCTGACAAGTTTGAGGTGTCTGCAGATAGTTCTACCAGTAAAAATAAAGAA  
CCAGGAGTGGAAAGGTCATCCCCTTCTAAATGCCCATCATTAGATGATAGGTGGT  
ACATGCACAGTTGCTCTGGGAGTCTTCAGAATAGAACTACCCATCTCAAGAGGA  
GCTCATTAAAGGTTGTTGATGTGGAGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCCACA  
CGATTTGACGGAAACATCTTACTTGCCAAGGCAAGATCTAGAGGGAACCCCTTAC  
CTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGA  
CAGAGCCCCAGAGTCAGCTCGTGTGGCAACATAACCATCTTCAACCTCTGCATTG  
AAAGTTCCCAATTGAAAGTTGCAGAATCTGCCAGAGTCCAGCTGCTGCTCATA  
CTACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAAGC  
CAGAATTGACAGCTTCAACAGAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGT  
CTGGCCTGACCCAGAAAGAAATTTATGCTCGTGTACAAGTTTGCCAGAAAACACCA  
CATCACTTTAACTAATCTAATTACTGAAGAGACTACTCATGTTGTTATGAAAACA  
GATGCTGAGTTTGTGTGTGAACGGACACTGAAATATTTTCTAGGAATTGCGGGAG  
GAAAATGGGTAGTTAGCTATTTCTGGGTGACCCAGTCTATTAAGAAAGAAAAAT  
GCTGAATGAGCATGATTTTGAAGTCAGAGGAGATGTGGTCAATGGAAGAAACCA  
CCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAGAATCCCAGGACAGAAAGATCTTCAGGGGGCT  
AGAAATCTGTTGCTATGGGCCCTTCACCAACATGCCACAGATCAACTGGAATGG  
ATGGTACAGCTGTGTGGTGGCTTCTGTGGTGAAGGAGCTTTCATCATTACCCCTGG  
CACAGGTGTCCACCCAATTGTGGTTGTGCAGCCAGATGCCTGGACAGAGGACAAT  
GGCTTCCATGGCAGGAGACCGGGTGTGGTGTGAACCGGTCAGGGATGTGGCA  
GGAAGAGGTGACTGTGCCCTCGGTCCAGACCTTCTGATTCTGAGGCCATGACC  
TTTGAGGAAGCTGCTGCCTTGCTCGTCAATTACATTACAGCCTACATGGTCCTCTT  
TGACTTCGGCAACCTACAGCCTGGCCACAGCGTCTTGGTACACATGGCTGCAGGG  
GGTGTGGGTATGGCTGCCGTGCAGCTGTGCCGTACAGTGGAGAATGTGACAGTGT  
TCGGAACGGCCTCGGCCAGCAAGCACGAGGCACTGAAGGAGAATGGGGTCACAC  
ATCCCATCGACTATCACACGACTGACTACGTGGATGAGATCAAGAAGATTTCCCC  
TAAAGGAGTGGACATTGTCATGGACCCTCTGGGTGGGTGAGATACTGCCAAGGGC  
TACAACCTCCTGAAACCCATGGGCAAAGTCGTCACCTATGGAATGGCCAACCTGC  
TGACGGGCCCCAAACGGAACCTGATGGCCCTGGCCCGGACATGGTGGAAATCAGT  
TCAGCGTGACAGCTCTGCAGCTGCTGCAGGCCAACCGGGCTGTGTGTGGCTTCCA  
CCTGGGCTACCTGGATGGTGTGGTGGAGCTGGTCAAGTGGTGTGGTGGCCCGCCTC  
CTGGCTCTGTACAACCAGGGCCACATCAAGCCCCACATTGACTCAGTCTGGCCCT  
TCGAGAAGGTGGCTGATGCCATGAAACAGATGCAGGAGAAGAAGAATGTGGGCA  
AGGTCCTCCTGGTTCCAGGGCCAGAGAAGGAGAAGTGGGCAAGTGGCTGTGAG  
ACCCTAGAGACCAGCGAAGGGAGAAGTTGGGAAGCTACGTTCTGTTGGCCACCA  
GACTTGCATTTACGCCTCTGTCATAATGCTCTGCCCTCCCTCCCCGAAGGTCTCT  
GTGGTGTGATGACCGCTCTCCCCTGCCCTCCCCGCTTCTGACCTCTGAAGAGGTTG  
GGAAGTGACCATTTGGATGTCTGGGCCCTGCCAAGGCGACAGGGAGGGTCAGAG  
GGAGGCCGGCTGCTTCTGCCCCACCTTTCCCCGGGCTGCTGTGCTGCTTTTG  
TGCCAAGGTTAGCCAGTCCCCCTGTTGTGTTCCATGTGCTTTCACCTCTGCCTCA  
TCTTTCCTCCCGTCCCTGCCCGCCACCTCCCCAAAGAATTGAAACGTCAGCTCAG  
GATATGGGGCCAATCTCTGTGAGTCCAGCATGTACCTGTCTCTCCCTAGTGTCCCT

TCAGCCTGGGCTGACCAGTGCCCGCCTCTGGGCTTGACCAGTTCCCAATCTCGTCC  
TCTGTCCCCAACTTCTTAAGCACAATTGGGCTTCTTCCATCTCCAGGTTTTCTGCC  
ATTCTTAACCAAGGCTGCCTCTTCCAACAGGGCGGGAATCAGACCTACTCCCCTA  
GGTCACAACCTCTGGGAAGGATACAGAGCCCCACCCTTCACTGAGTTCTCTGGAT  
TTGTTCTCAGTGCCTTAGCAACGAAAACCTGTGCTTGTGTGTGTGTGGCGGCGGG  
GAGGGAGGATCCTGTTTCCCACCTCCTTCTCCTCCCCTGTACTCCCCAGTGCCTTC  
CTTGTTCTGGTGGAGCTGGGGTTTTCTCCTCCCAGTCCCACAACACTGCCAAAA  
ATCTGTGTATGTGCCATTGGGTGGGGCAGCCCCAAGCCTCCTGGGGAGGCAGGGC  
AAAAACAGGTGCCCTCATCGTGGTCTGTGCCATGTCCCGTCTCTATGGTGGTTGA  
GGAGAAAGGCGGGGAAGCTTCTCAGCCTTGCAGATATGTGTGGCATTACTAGC  
CAGAGCTCTGAAAGGCAGTGCTGTCTGTTTCTTGTACTGGGACCAAAGTAAAAAT  
CCAAGCACATTCCCCTTGCAGTTAGGGGAGGCCCTACTGCCTTCTCAAAGCAGAG  
AGGCAGCTTATCAAACCTCAGCCAAAACCTCTGTTTACATGGGTGGGGAGATGGAG  
CAGGGAAGTACAGAGTGGGATGGTCAGGACCTGGGCCATTGCAACCAAATGGG  
GACTTCTGGGTAGGGAGGTCACTCCCTCTACTCACTGAGCTAGGATTAGGGAGG  
GTTATTGCCCAACCATTGCAATGGGAGGTGGAGGGACAGGCTCAGCCTCCTCAT  
TGTCTAAATGAGGCCTAAATGTGTGAAGTGCGATTTCTGCTTTTGTGTACCCACC  
ACCCATTACCACAGCTGCCTTTGTGTGTTTGTGTCAATAAAAAGCCAAACCCTG

>CDS9225.1

ATGGATTTATCTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGTACAAAATGTCATTAATGCTATGC  
AGAAAATCTTAGAGTGTCCCATCTGTCTGGAGTTGATCAAGGAACCTGTCTCCAC  
AAAGTGTGACCACATATTTTGCAAATTTTGCATGCTGAAACTTCTCAACCAGAAG  
AAAGGGCCTTCACAGTGTCTTTATGTAAGAATGATATAACCAAAGGAGCCTAC  
AAGAAAGTACGAGATTTAGTCAACTTGTGGAAGAGCTATTGAAAATCATTTGTGC  
TTTTAGCTTTGACACAGGTTTGGAGTATGCAAACAGCTATAATTTTGCAAAAAG  
GAAAATAACTCTCCTGAACATCTAAAAGATGAAGTTTCTATCATCAAAGTATGG  
GCTACAGAAACCGTGCCAAAAGACTTCTACAGAGTGAACCCGAAAATCCTTCCCT  
GCAGGAAACCAGTCTCAGTGTCCAACCTCTAACCTTGGAAGTGTGAGAACTCTG  
AGGACAAAGCAGCGGATACAACCTCAAAGACGTCTGTCTACATTGAATTGGGA  
TCTGATTCTTCTGAAGATACCGTTAATAAGGCAACTTATTGCAGTGTGGGAGATC  
AAGAATTGTTACAAATCACCCCTCAAGGAACCAGGGATGAAATCAGTTTGGATT  
TGCAAAAAGGCTGCTTGTGAATTTTCTGAGACGGATGTAACAAATACTGAACAT  
CATCAACCCAGTAATAATGATTTGAACACCACTGAGAAGCGTGCAGCTGAGAGG  
CATCCAGAAAAGTATCAGGGTAGTTCTGTTTCAAACCTTGCATGTGGAGCCATGTG  
GCACAAATACTCATGCCAGCTCATTACAGCATGAGAACAGCAGTTTATTACTCAC  
TAAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAATTTCTGTAATAAAAAGCAAACAGCC  
TGGCTTAGCAAGGAGCCAACATAACAGATGGGCTGGAAGTAAGGAAACATGTAA  
TGATAGGCGGACTCCCAGCACAGAAAAAAGGTAGATCTGAATGCTGATCCCCT  
GTGTGAGAGAAAAGAATGGAATAAGCAGAAACTGCCATGCTCAGAGAATCCTAG  
AGATACTGAAGATGTTCCCTGGATAACACTAAATAGCAGCATTGAGAAAGTTAAT  
GAGTGGTTTTCCAGAAGTGAATGAACTGTTAGGTTCTGATGACTCACATGATGGGG  
AGTCTGAATCAAATGCCAAAGTAGCTGATGTATTGGACGTTCTAAATGAGGTAGA  
TGAATATTCTGGTTCTTCAGAGAAAATAGACTTACTGGCCAGTGATCCTCATGAG

GCTTTAATATGTAAAAGTGAAAGAGTTCCTCCAAATCAGTAGAGAGTAATATTG  
AAGACAAAATATTTGGGAAAACCTATCGGAAGAAGGCAAGCCTCCCCAACTTAA  
GCCATGTAACCTGAAAATCTAATTATAGGAGCATTGTACTGAGCCACAGATAAT  
ACAAGAGCGTCCCCTCACAAATAAATTAAGCGTAAAAGGAGACCTACATCAGG  
CCTTCATCCTGAGGATTTTATCAAGAAAGCAGATTTGGCAGTTCAAAAAGACTCCT  
GAAATGATAAATCAGGGAACTAACCAACGGAGCAGAATGGTCAAGTGATGAAT  
ATTACTAATAGTGGTCATGAGAATAAAACAAAAGGTGATTCTATTCAGAATGAGA  
AAAATCCTAACCCAATAGAATCACTCGAAAAAGAATCTGCTTTCAAAAACGAAAG  
CTGAACCTATAAGCAGCAGTATAAGCAATATGGAACCTCGAATTAATATCCACAA  
TTCAAAAAGCACCTAAAAAGAATAGGCTGAGGAGGAAGTCTTCTACCAGGCATAT  
TCATGCGCTTGAACCTAGTAGTCAGTAGAAATCTAAGCCCACCTAATTGTAAGTAA  
TTGCAAATTTGATAGTTGTTCTAGCAGTGAAGAGATAAAGAAAAAAAAGTACAAC  
CAAATGCCAGTCAGGCACAGCAGAAACCTACAACCTCATGGAAGGTAAAGAACCT  
GCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAACAAGCCAAATGAACAGACAAGTAAAAGACA  
TGACAGCGATACTTTCCAGAGCTGAAGTTAACAAATGCACCTGGTTCTTTTACT  
AAGTGTTCAAATACCAGTGAACCTAAAGAATTTGTCAATCCTAGCCTTCCAAGAG  
AAGAAAAAGAAGAGAACTAGAAACAGTTAAAGTGTCTAATAATGCTGAAGACC  
CCAAAGATCTCATGTTAAGTGGAGAAAGGGTTTTGCAAACCTGAAAGATCTGTAGA  
GAGTAGCAGTATTTTCATTGGTACCTGGTACTGATTATGGCACTCAGGAAAGTATC  
TCGTTACTGGAAGTTAGCACTCTAGGGAAGGCCAAAACAGAACCAATAAATGT  
GTGAGTCAGTGTGCAGCATTGAAAACCCCAAGGGACTAATTCATGGTTGTTCCA  
AAGATAATAGAAATGACACAGAAGGCTTTAAGTATCCATTGGGACATGAAGTTA  
ACCACAGTCGGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGAACCTTGATGCTCAGT  
ATTTGCAGAATACATTCAAGGTTTCAAAGCGCCAGTCATTTGCTCCGTTTTCAAAT  
CCAGGAAATGCAGAAGAGGAATGTGCAACATTCTCTGCCACTCTGGGTCTTTAA  
AGAAACAAAGTCCAAAAGTCACTTTTGAATGTGAACAAAAGGAAGAAAATCAAG  
GAAAGAATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATATCACTGCAGGCTT  
TCCTGTGGTTGGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGTAGTATCAA  
GGAGGCTCTAGGTTTTGTCTATCATCTCAGTTCAGAGGCAACGAAACTGGACTCA  
TTACTCCAAATAAACATGGACTTTTACAAAACCCATATCGTATACCACCACTTTTT  
CCCATCAAGTCATTTGTTAAAACCTAAATGTAAGAAAAATCTGCTAGAGGAAAAC  
TTGAGGAACATTCAATGTCACCTGAAAGAGAAATGGGAAATGAGAACATTCCAA  
GTACAGTGAGCACAATTAGCCGTAATAACATTAGAGAAAATGTTTTTAAAGAAGC  
CAGCTCAAGCAATATTAATGAAGTAGGTTCCAGTACTAATGAAGTGGGCTCCAGT  
ATTAATGAAATAGGTTCCAGTGATGAAAACATTCAAGCAGAACTAGGTAGAAAC  
AGAGGGCCAAAATTGAATGCTATGCTTAGATTAGGGGTTTTGCAACCTGAGGTCT  
ATAAACAAAGTCTTCCCTGGAAGTAATTGTAAGCATCCTGAAATAAAAAAGCAAG  
AATATGAAGAAGTAGTTCAGACTGTTAATACAGATTTCTCTCCATATCTGATTTCA  
GATAACTTAGAACAGCCTATGGGAAGTAGTCATGCATCTCAGGTTTGTCTGAGA  
CACCTGATGACCTGTTAGATGATGGTGAATAAAGGAAGATACTAGTTTTGCTGA  
AAATGACATTAAGGAAAGTTCTGCTGTTTTTAGCAAAAAGCGTCCAGAAAGGAGA  
GCTTAGCAGGAGTCCTAGCCCTTTCACCCATACACATTTGGCTCAGGGTTACCGA  
AGAGGGGCCAAGAAATTAGAGTCCTCAGAAGAGAACTTATCTAGTGAGGATGAA  
GAGCTTCCCTGCTTCCAACACTTGTTATTTGGTAAAGTAAACAATATACCTTCTCA

GTCTACTAGGCATAGCACCGTTGCTACCGAGTGTCTGTCTAAGAACACAGAGGAG  
 AATTTATTATCATTGAAGAATAGCTTAAATGACTGCAGTAACCAGGTAATATTGG  
 CAAAGGCATCTCAGGAACATCACCTTAGTGAGGAAACAAAATGTTCTGCTAGCTT  
 GTTTTCTTCACAGTGCAGTGAATTGGAAGACTTGACTGCAAATACAAACACCCAG  
 GATCCTTTCTTGATTGGTTCTTCCAAACAAATGAGGCATCAGTCTGAAAGCCAGG  
 GAGTTGGTCTGAGTGACAAGGAATTGGTTTCAGATGATGAAGAAAGAGGAACGG  
 GCTTGGAAAGAAAATAATCAAGAAGAGCAAAGCATGGATTCAAACCTTAGGTGAAG  
 CAGCATCTGGGTGTGAGAGTGAAACAAGCGTCTCTGAAGACTGCTCAGGGCTATC  
 CTCTCAGAGTGACATTTTAACCACTCAGCAGAGGGATACCATGCAACATAACCTG  
 ATAAAGCTCCAGCAGGAAATGGCTGAACTAGAAGCTGTGTTAGAACAGCATGGG  
 AGCCAGCCTTCTAACAGCTACCCTTCCATCATAAGTGACTCTTCTGCCCTTGAGGA  
 CCTGCGAAATCCAGAACAAAGCACATCAGAAAAGCAGTATTAACCTTCACAGAA  
 AAGTAGTGAATACCCTATAAGCCAGAATCCAGAAGGCCTTTCTGCTGACAAGTTT  
 GAGGTGTCTGCAGATAGTTCTACCAGTAAAATAAAGAACCAGGAGTGGAAAGG  
 TCATCCCCTTCTAAATGCCCATCATTAGATGATAGGTGGTACATGCACAGTTGCTC  
 TGGGAGTCTTCAGAATAGAACTACCCATCTCAAGAGGAGCTCATTAAAGGTTGTT  
 GATGTGGAGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCCACACGATTTGACGGAAACA  
 TCTTACTTGCCAAGGCAAGATCTAGAGGGAACCCCTTACCTGGAATCTGGAATCA  
 GCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCCAGAGTC  
 AGCTCGTGTGGCAACATAACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCCAATTGA  
 AAGTTGCAGAAATCTGCCAGAGTCCAGCTGCTGCTCATACTACTGATACTGCTGG  
 GTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTC  
 AACAGAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGTCTGGCCTGACCCCAGA  
 AGAATTTATGCTCGTGTACAAGTTTGCCAGAAAACACCACATCACTTTAACTAAT  
 CTAATTACTGAAGAGACTACTCATGTTGTTATGAAAACAGATGCTGAGTTTGTGT  
 GTGAACGGACACTGAAATATTTTCTAGGAATTGCGGGAGGAAAATGGGGTAGTTA  
 GCTATTTCTGGGTGACCCAGTCTATTAAGAAAGAAAAATGCTGAATGAGCATGA  
 TTTTGAAGTCAGAGGAGATGTGGTCAATGGAAGAAACCACCAAGGTCCAAAGCG  
 AGCAAGAGAATCCCAGGACAGAAAGATCTTCAGGGGGCTAGAAATCTGTTGCTA  
 TGGGCCCTTCACCAACATGCCACAGATCAACTGGAATGGATGGTACAGCTGTGT  
 GGTGCTTCTGTGGTGAAGGAGCTTTCATCATTACCCTTGGCACAGGTGTCCACCC  
 AATTGTGGTTGTGCAGCCAGATGCCTGGACAGAGGACAATGGCTTCCATGGCagga  
 gaccgggtgatggtgtgaaccggtcagggatgtggcaggaagaggtgactgtgccctcgtccagacctctgattcctgaggcca  
 tgaccttgaggaagctgctgccttgctcgtcaattacattacagcctacatggctcctttgacttcggcaacctacagcctggccacagc  
 gtcttggtacacatggctgcagggggtgtgggtatggctgccgtgcagctgtgccgtacagtgagaaatgtgacagtgttcggaacgg  
 cctcggccagcaagcacgaggcactgaaggagaatggggtcacacatccatcgactatcacacgactgactacgtgatgatca  
 agaagatttcccctaaggagtgacattgcatggacctctgggtgggtcagatactgccaagggtacaacctctgaaacctatg  
 ggcaagtcgtcacctatggaatggcaacctgctgacggggcccaaacggaacctgatggccctggccccgacatggtggaatca  
 gttcagcgtgacagctctgcagctgtgcaggccaaccgggctgtgtgtggctccacctgggctacctggatggtgaggtggagctg  
 gtcagtgggtgtggccccctcctgctctgtacaaccaggggccacatcaagccccacattgactcagctctggcccttcgagaaggt  
 ggctgatgcatgaaacagatgcaggagaagaagaatgtgggcaaggtcctcctggtccaggggccagagaaggagaactag

>Fusion\_2\_\_BRCA1-VAT1\_NM\_007294.3-

NM\_006373.4\_translation\_of\_CDS\_NP\_009225.1-NP\_006364.2\_PCO65\_CDS4

MDLSALRVEEVQNVINAMQKILECPICLELIKEPVSTKCDHIFCKFCMLKLLNQQKGP  
 SQCPLCKNDITKRSLQESTRFSQLVEELLKIICAFQLDTGLEAYANSYNFAKKENNSPEH  
 LKDEVSIQSMGYRNRARLLQSEPENPSLQETSLSVQLSNLGTVRTLRTRKQRIQPQKT  
 SVYIELGSDSSEDTVNKATYCSVGDQELLQITPQGTREISLDSAKKAACEFSETDVT  
 NTEHHQPSNNDLNTTEKRAAERHPEKYQGSSVSNLHVPCGTNTHASSLQHENSLL  
 LTKDRMNVEKAFCNKSKQPGLARSQHNRWAGSKETCNDRRTPSTEKKVDLADPL  
 CERKEWKNQKLPCSENPRDTEVPWITLNSSIQKVNEWFSRSDPELLGSDSDHGESES  
 NAKVADVLDVLNEVDEYSGSSEKIDLLASDPHEALICKSERVHSKSVESNIEDKIFGK  
 TYRKKASLPNLSHVTENLIIGAFVTEPQIIQERPLTNKLKRKRRTSGLHPEDFIKKADL  
 AVQKTPEMINQGTNQTQNGQVMNITNSGHENKTKGDSIQNEKNPNPIESLEKESAF  
 KTKAEPISSSISNMELELNIHNSKAPKKNRLRRKSSTRHHALELVVSRNLSPPNCTELQ  
 IDSCSSSEEIKKKKYNQMPVHRNLQLMEGKEPATGAKKSNKPNEQTSKRHDSDTF  
 PELKLTNAPGSFTKCSNTSELKEFVNPSLPREEKEEKLETVKVSNNAEDPKDLMLSGE  
 RVLQTERSVESSISLVPGTDYGTQESISLLEVSTLGKAKTEPNKCVSQCAAFENPKGL  
 IHGCSKDNRNDETEGFKYPLGHEVNHSRETSIEMESELDAQYLQNTFKVSKRQSFAPF  
 SNPGNAEEECATFSAHSGSLKKQSPKVTFECEQKEENQGKNESNIKPVQTVNITAGFP  
 VVGQKDKPVDNAKCSIKGGSRFCLSSQFRGNETGLITPNKHGLLQNPYRIPPLFPIKSF  
 VKTKCKKNLLEENFEEHSMSPEREMGNENIPSTVSTISRNNIRENVFKEASSSNINEVG  
 SSTNEVGSSINEIGSSDENIQAELGRNRGPKLNAMLRLGVLQPEVYKQSLPGSNCKHP  
 EIKKQEYEEVVQTVNTDFSPYLISDNLEQPMGSSHASQVCSETPDDLDDGEIKEDTSF  
 AENDIKESSAVFSKSVQKGELSRSPSPFTHHLAQGYRRGAKKLESSEENLSSSEDEELP  
 CFQHLLFGKVNIPSQSTRHSTVATECLSKNTEENLLSLKNSLNDCSNQVILAKASQE  
 HHLSEETKCSASLFSSQCSELEDLTANTNTQDPFLIGSSKQMRHQSESQGVGLSDKEL  
 VSDDEERGTLGLENQEEQSMDSNLGEAASGCESETSSEDCSGLSSQSDILTTQQRD  
 TMQHNLIKLQQEMAELEAVLEQHGSQPSNSYPSIISDSSALEDLRNPEQSTSEKAVLTS  
 QKSSEYPISQNPEGLSADKFEVSADSSSTSKNKEPGVERSSPSKCPSLDDRWMHSCSG  
 SLQNRNYPSEELIKVVDVEEQLEESGPHDLTETSYPRLQDLEGTPYLESGISLFSDD  
 PESDPSEDRAPE SARVGNIPSSTSALKVPQLKVAESAQSPAAAHTTDTAGYNAMEESV  
 SREKPELTASTERVNKRMSMVVSGLTPEEFMLVYKFARKHHITLNLITEETTHVVM  
 KTDAEFVCERTLKYFLGIAGGKWVVS YFWVTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRN  
 HQGPKRARESQDRKIFRGLEICCYGPFTNMPDQLEWMVQLCGASVVKELSSFTL  
 GTGVHPIVVVQPDAWTEDNGFHGRRPGDGVPEVRDVAGRDCALGPDLPDS\*GHDL  
 \*GSCCLARQLHYSLHGPL\*LRQPTAWPQRLGTHGCRGCGYGCRAAVPYSGECD SVR  
 NGLGQQARGTEGEWGHTSHRLSHD\*LRG\*DQEDFP\*RS GHCHGPSGWVRYCQGLQP  
 PETHGQSRHLWNGQPADGPQTEPDGPGPDMVESVQRDSSAAAAGQPGCVWLPPGLP  
 GW\*GGAGQWCGGPPPGSVQPGPHQAPH\*LSLALREGG\*CHETDAGEEECGQGP PGS  
 RAREGEL

**APÊNDICE B - Sequências do mRNA; CDS e tradução para a fusão *BRAF-TMEM178B***

>mRNA 1195278.2

GTTATAAGATGGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGCGGCGCGGAGCCGGGCC  
 AGGCTCTGTTCAACGGGGACATGGAGCCCGAGGCCGGCGCCGGCGCCGGCGCCG  
 CGGCCTCTTCGGCTGCGGACCCTGCCATTCCGGAGGAGGAGAAATTGAGCGATGT  
 ACGTACATCAAATACCACTACTCCTCAGCAACCATCCCCAGGAACCTCACTTTCA  
 ATATCACGAAGACCATCCGTCAGGATGAGTGGCATGCCCTACACCTGCGCAGAAT  
 GACGGCTGGCTTCATGGGCATGGCGGTGGCCATCATCCTCTTTGGCTGGATCATC  
 GCGGTGCTGGGCTGCTGCTGGGACCGAGGCCTTATGCAGTACGTGGCAGGGCTGC  
 TCTTCCTCATGGGAGGAACCTTCTGCATCATTTCACTGTGCACCTGTGTGGCCGGG  
 ATCAACTTTGAGCTGTCACGCTACCCACGCTACCTGTACGGACTCCCTGATGACA  
 TCAGCCATGGCTATGGCTGGTCCATGTTCTGTGCATGGGGGGGCCTGGGCCTCAC  
 ACTCATCTCGGGATTCTTCTGTACCTTAGCCCCCTTCTGTTCAACCTGTCCCAGGA  
 CCAACTACCCTAAATCCAGACCCGAGAATGGGACAGTGTGCTAAAAAACAACC  
 CATAACATATATATATATAAATATATATATATAATATACATATATAAAACAA  
 AACAAAATAAATCAAGACGATGCCAGTGCCAAGGTAGAGTTGAGTTGGCTCAG  
 GCACCTGCATCTCGCCGACTTTGTGTTGCCTCATCTCTGAGATGGGGAAAGTTTT  
 TCCATCCTGTGGCTCTTCCATCAGTTCTTGACTTTTGGCTTCATGGTCTCTTGAAGA  
 CAGAGCAAACACCACCCTTGCAGCCGCGTCTTGATCCCCATCACTGGCGAGGAT  
 GGGGTGGTGAAGGGACAGTGGAAAGGGGTCTGAGGCAGCACAGATGTAGAGAAG  
 GAAGTGCCACCCACTGGGTCAACGGGAGAGGACGCCACCCCTAACCAGTCATAT  
 CACAGGGTAACAAAGCCCTCAGTTCCTAGAATGTAACCAAATTATTGAGGCCATT  
 TTCAGAATCACTTCTTCTCCTGCTCTTCTGTTCCGGACTTCCTTCCCAGCCCACCAG  
 CAACACACAAGGAGTGGAAAGAGAAAACAAACTGAGAAGGACGTTTTCTCTTTC  
 TGCCAAACTTTTGGACCATGTTTCATAGGTGGGAAGGGAAGAGAACATGCTGAG  
 AGGCAAGATCTGCATCAATGAAAGGACGCTTCGGTGGATGCTCAGACAACCCAG  
 TCTTACCTTCCAGCTGCCTTACACCCAGTGAAACAAGAGGCCACCCTGTCCCAG  
 CCGCACCTGCACTCCCTGGGACAGCTGGAGCCTTGGAGTCATGCTGTGATGTGTG  
 TGTGTGGGTGTGCGTGCATGTGTACTTTGGGCGGTTTCCTTTTTTTCTTTTCTACCT  
 TTTAAATGGAAATACTGCATTATGACTGTTGTCTCTCTTATCACTGTAGTGGTTTC  
 ATGGCCCCAGATAGAGGCCAGAGACCTAGAAATTGTCATGAGGGACAGGCCTA  
 TAAGGGTGCCAATTCTGCAGCTACAGATCCCTGGAGTGGTGTGTGTGTGCGTGTG  
 TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGTGGATGTTTCTTGAGCGTGGGGT  
 TTTATTGTTTGTGTTGTGTTTTTTTTAAATTGTTTCTGGTATAGCTGAAATTTCCAGA  
 GGGCAGAACCAAGAACAAGCCACTGGGCCAGAGGACCCCCGTGGTTCTCCACA  
 TTACAGCTCTGGGACTCTGCACGATTTAGTCCTCTAATTTTGAAGTTCAAGACAC  
 AGCTGGGCACATAAGCCATGAGAGAAGAGGGGGAACACACAGTTCAGGAGAGA  
 GAAGAAATGTTGCTCTGGTTGCTGTTGTACAAGAACATAAACCAACAAGACCTTC  
 ACTCCCCATTATAGAAGCTGTCCCTTTGTCACTGGACATCTCCCCTTTCCCTAGGGG  
 TGACCTCTGTACAAACGAAAGGAAGTGGGTACATGCAGAGAGAGCACCTCCAT  
 TTCCCATGGGCTCAAGTTTGTATGATATTGTGTAAATTAATGCAGAACTCTTGACT  
 CTTTCCATCCTCTTCCCTTCCCTCTTGATATTCAAGGCCATGAATCCCAAATAAC

AGTCTTAGTGGCTAGCACCCAAACAGAGGTGGAATAAATCCACCCCAGTGTCTCG  
GGCTCATTGAGCAAATTAGCACTGCAGGTGCTGGCAAGCAAAGTCAGCCAGAG  
AGTTGTGAACGCTGTAGGGGTGGGAGTCTGCTGGAGTGGGCTGGAGCCGCTCAC  
AGTCATCTCAGTGAGCCTGCTGGTGCCCAGCAGCCCTGGGGAGGCCAGGTGAGA  
ATCCCTGAGCTGGTGTAGCCATGGTCAACTGTGTAGCAGAGAATCCCCTTGTTTC  
ATAAACAAATATGCTTTGGGAGCTTTGCCAGGCACTCAGCAGCCTTTCTTCCACT  
GCTGTGTAATCTGTTTCATTTACACGTCTTCCAACCCATCTTCTTACCCTCTCCTC  
CTTTTCTCACCTACTAACCCTTACCTTCTCTCTCTTCTATCTTCCACCCTCATCTG  
CTCCTTTGAACTGCGTGTATGTAATTCATATCTGGATATGATATGACATCTGATGT  
GCATGAATGGGGTTGAATGTGGATCTCTCTGTATGTGTATCTCTCTGGTGCATTTT  
GTGTACGTTTGTGTCAGTACACACCTGCACACAGGTGTGGGTGCCCTACTCAAGA  
CTTCCTTACCGGGGACTCTGGTCAGCTTCTGCAAAAGGTCTCATGTGTGAGTTCCC  
TGTGTGTGGGTGTGCTGGGCGATAGGGTAAGGTGTGCAACGGGAAAAGTTGTTA  
GCTTCCAGTTGGGGTTCTAAGGATTATTTTTAAAACAAAGGATTTATTCTATGAGA  
AGGGAAATAATTTTCAGGAAAACCCAGTTTTTCAATTGGGCATTTTATTTCTAATT  
TTCTTTGAAAAGTTAGATTTCTCCCTTAAGGGGAAGGGCATACTTGGGCTTAAGG  
AAAAGTGAAGAAAAGTATCTCAGATTGAGAGGCCTTTTGTCTTCCCTCCAAGCGT  
CCTGAAGGGGCTCTGCCGAGGAAGGGACAGACAGGTTCACAAGCATCCATTTGG  
GGGAGAGGGCTTGTCTATGACCACACTGAAATTCAGCTTTTTTCCAGTTGCAGG  
AGAGAGGGGAAAATTCTAAATGGGGAAATTTGCTATGAACCATTTAACTTTTT  
GTAAGTAATCATGTTTGAGGATGCTGGCTCACAGACCTATCATTATTTATATCCTC  
TTTTTAAAAAAAATCCCATACTTTCAATGAATAGATTATCTGCTCTATCCAATTA  
TTGTCTTTGTGACAGACATTTAGCAAAGCTTACTGCATCCCTTTGAAACCTTGAGA  
GTTCTGAAATGTTAGAAAGCTCCCAGGAAAGACGTAAACAACCTGGGCTCAACT  
CACCAGCCCAGAGCAGGGGCTTTGAGTGACTTCTTTGATAGCAGGACCAGATAAA  
TACGAACACACTTTGGGATCTGATCCTGCTGGGAAGCAAAAGACGCCCAGCCAC  
ATGACCAGGATAGAGGCCCTTTCAGACGGCAAGTCCTGGCCAATGGGAGGACT  
TCTCAGGTGACCTTGATCCCTCTAGCATAAGGGCTTGACCACAGATTAACATG  
TGACTCCAACCAGTTACGGAAGCTTTCTGGCTGTGAGGTAGCTGAGGGAGATGAG  
GAGGAGGAAGAGAGGAGCCTTGACTTGTGAGGCTCTGTAGGTCAGACTCTGCTA  
ACTCCAAATCAAAGTGGAACCCAACCTTATGAGGGCATTAGGGTCAATGACCTC  
ACTAAAGTCACCAGCCGCAACCCCAGGTCAAGTTCAAACCTTCTTACTGGCATATG  
AACATGTATGTGCTTTGAGCTCCATGCAAGTCAACCTTGAGCCTGGGGCCATTG  
CAACTTTTATTTCCCTCCCTACTCTACTACCTTGAGATTCAGGAAAGTGAGGTATT  
CTACCTAGAGAGAGGTCCCATATCTTTTTCTCCTTATTTTGGGAGTTACGGTTTCT  
TCTTCTGTTTCCGTTTCCCTCTCTCTACTCACTCCTACTTTCTCCTGCATCAACTTT  
GGTCAATTAACATAGACAAGTGATTCATCTGTAGAGAGGCTCCTAGACTCCAAGC  
AGCCCCCTTCCCTTGTTTCATTGTGGCTGTAGGTTTTATAAGGAGGTCTGTGGCTCCC  
TGGCATCAAATATGAAAAATAAAATCTGTGCCTGTTCCAGCTTCAATCCTCCTC  
CAAGCCTTAGCTTTTCAACAACCTACCCTTTCAACTTCAGGGATCATGGAGTCAC  
AGAGACTGGACAACCTCCTCAAATCTAGACAAAGACTTTCTTAAGCGCCCTGAGC  
CCAGGTGCATATCTTCCCATCAGGGATGAGTGGTCCCACCTAGCAATGCTTGCCT  
CTCCTGTGACAAGAGGGTAGGATATCCTAGGACTCTGAGACTGGGCCCTATATCT  
CAATATTCATCCACACTCATGATAAGATGCCGGAATGAATGCACTGTGTGTAGC

TGTCTTGATTTAGTGGGAGGATGTGCTGCTTAGGTCTCCAAAGATGCCACCTGG  
GTCAAATTCAGAATAATGAACTCAGGTACATCACCCAGAGGCATTTAGAATGGAC  
TCTCTCTTCACCTGGATTATGTGCTGAGTGTTAAGTGATTTTTCAAATATCTGGGG  
GAAGGAGTGGGAAGAGATACACTCTGGTCATCCTTTGGTGTGGTTTGTGGGGGAT  
ACTTGGTTGATTCTTGTAGTTAAAGTGAAGTTGCTTTTCTGAAAATGTTCCCTGTC  
TTCAGGGGACTTACCCATCCCAGGGGACACATCCATCCCAGGGGACACAGCCAG  
CCCTTTCCAGGGAAATACGATGTTTCTGAGTGAGAGGTGATTTTCAGTGCAGATAG  
GAAGAGCTGGTGCACACCAGCAGGGTTGCCTTCCATGCCATCTTCCAGCTGGTGT  
GGGATAGACTAAGGGGGCAGATTTTTAAGAACCCACCAGAGTTGACATACACA  
CGTGATTCTCGTGTCTGTCTCTCAAAGCTCTCAATGTCTGGGGCTGTGTTTGCCCT  
CTTTTCATTGATGCTGCCATGATGCAAAATGTTTCTTAAACATTATTCCTGGTTCTT  
AGAATATGTGATTACTGAGTATTGGATTTCTTTCCCTGAATAATAACTGCTCATTGT  
AGAAAATAAGAAAAATAAAATACAAAAAAGACTACAAGATTTTTTCATAATCCAG  
TCACTCTGAGGCATCTACCGCGGGCCCAATCCAAATGGTCATGACCTCAAACTT  
CCCCAATGAGTGCTTGTCTCTGGGTTGGCAGCTGGGGCCATGTGAGCAGTGTACA  
CCACAGAACCGCACTGGTCTGCGTTGAGTTGACCCTGTGTTCCCTGGCAGCAAGAG  
TGCAGGGCCCTGAGCCCCCAGAGATAGCAAAGAGGCCTAAAAGTTTAATGCCAG  
ACCTTAGGGGCAGGATGGAGCAGGGCTAAAAGATGTCTCTTTGGGCCTGTCTGCC  
TGCTTTCCTTCCCTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTTTGGTCAGTTGCCATCTCAATCT  
AATCATAGATGTAAGAATGCGGAAGCCAGAGTAACTCACTCATTAAAGCTACACTT  
GTGTAACAGTTACTGTAAATTTCACTACAGCTCTGCACTGAAATGATTTGTGACTC  
TGGGCACTGTGTCTTCTCCATACTTGAACCTCCTCATCTACAAAATGAGGATAAGT  
GATAACACCTTACCTCATGGTATATTAAGGGTGACAAAGAAATTGCAAAGTGATT  
TGCAAACATGAAGTGTCATATGAGTTATGTATGTTCTAATTATCCCTCAGAAGAC  
CCCCCGCTGGAATGGAATTCTCACATCAAGTGTCTGTGCCTCGCTGCTGAAGGAT  
AACCCAGAGTGCAAGGTCATCTTTGTTGCTGAACAGGGCTGGACCTGTGCACTT  
AAGCACACTTAAAGGATTCTATTCTTCATTCAGGTCCCCCAGAGAAATTGGCTCC  
TTATTTTTCTTTACCTATTCCTAGACTTCCTTTTGTCTAGAGCCAGTTTTGCAAAGG  
GCACTTTTATCCATCTCAGTTATTCCCAGAGGTGACAGAATGAGTAAACCATATG  
GGGCAAATAGCATATATGAGCTAAACCAGTTAACTGTTAACCAAGGCACATGGTC  
AATGCCTTAGTATTTTTTTTTTTAATTCTCCTAACGTTATTTCTAGCTGTACATTCC  
CAAAGGAATGGGTGGAAGCAAATCAGATTCTGAAAGGTTTCAATGATCTTTCAA  
GTTTAGGATGAGACCAAGTCTCAAGGAGCTGGGATCTTCTTTCTCTTGTGAGTTGC  
TGAAGCCAGTAGCTTCGTCAAAAACATATGAATTCATATAAGGAAGCCCTTTAGA  
TGGTACATTCACTAAGACGTGTCTGGGTGTGATCCTGTTTGGGAAAAACAGAATC  
CTAGGTTCTAAACAAGAAAAGAACGCCCTTCCCAAAGGGTCCGCACACTTTCTGC  
TTTGCAGCGGATCAAGTGTCCTTGTGAGGGTGAGACTTCCTTCAAGGGAAGGGAA  
GCCATTGCTCTCTGTAGATAGAGCCCAGCTGGTAACGGGGGAGCCACCCA  
GCAGGGGGGTGTATGTTTCAGGTGTGAAAAACAGAAAACACTGGGTCTGAACATGAA  
GAGTTGCACAGCAGTAGTTTCAAGAAGCTGGCATCTCTTTGGCAAACACCAACCT  
CAGCAAATGCAACTCCTACACTTCATTCCCAAGGACCAGGTGTTGCTCCTTAAGG  
AACTCTGTATCCCTCTCTCCTCTCCAGAACCCCATTCCTCCCACTGGCTGAGCTTT  
TCCTTTCCTTTCCGGGTACCCATAGACCCTCTCCGTCTGTACCAGTGCGTCTGTG  
TTGTGAGCGTGACGAAGCCTTTCCTGTGAAGAGCTTTCATGAACTCATTCTCATAC

TCCTTCCCCATTTCCACCCATGGTGTGACTGTTTTGCTATTCAAGACTATCTGTAA  
AAATGTACAAATAAAAGTGAAAAGTAAAATAAAAGGGGAGGGAGATTGAGATTA  
AACAAATGCAATGATGTAGCCCTTAGTTTTCTGAGGACTTCTGTGGACGGCCCTA  
AAATCCTGAGTTAGGGTGGGATATGAAGGGAGGGATACCATTGACACAGGAGGT  
TTTTTTCTGGTTGTTTCTCTCACAGTCATCAGTGTCTGCTTAGAACTCTCTGTTCTA  
AAGGTTTTTCCCTGTAAAGTAGAATGCACTTCCCCAAAATAAAAGTAAATCAGC  
AATGTTTGAAGGGTCATGGCAAGGGTCATGACAAAGACCTGACTCTGGGGTGGC  
ATGAGTGGCCCTGTCACCGGCTCACTCAGGGCCTTGGGGGAGTCTCATTACCTCA  
CCTTGTCTCCACGTCTTCTCAGCCAAATGGGGATCAGGGGCTTCCAGGGCTCTGG  
GGGTGCGCAGTCCCCTTGTGTATTTTGTGCTATTTCTAGAGAGACTTTGAGCCCT  
TGCTAGTGCGTGCTTACTGCATGGAGGTAATTAGGAGATGTTTTCTCTCTGCTAC  
TCCTGGCCTCTGCTTTCGCCCTCAGAAAGTGACCTTGAGCTAGCAGCCAGTTTGC  
ACTCAGAGTCCAGAGCCTTCTATCTACCGTTTCATTCTCAGATTCCTTTTTCCACC  
CACTTTGACGATCTCATTTTACTATCAGTCTCTACTGACTGAGCTTTGCTGCACTG  
GGCTGGGGTAGGAGAAAGAGCATCCAAGGAGATGATGTGTGAATTGCTTTGTAA  
TTTATGACTCACCATATAAATGTGGCTTGCAGTGTGAGAAGCAGGGAGTCTGGCC  
AAGGGTTGCTACCAAATAAGACTGAAGATGGTGGAGGCAGTGGTGGCGTGGAGG  
CAGTAGGCAGAAGATGTGGGTTGGGAGCAGAGGTAAGATGAACGGAGCTTTGGG  
AAGGACAGATGGCAGAAGCACCAGAAAATCCTCAGCAAGGCAGCAGAGAAGGA  
TCCTCAAAGCAGTAACCCTGAAGTAATAGGAAGTAGGAAAGAGGAGCAGGGATT  
AGGTAAATCTGCAGCATAAACAGCTGTCTCCCTGCAGGACTGAGAAGACCAGCT  
GCCCCAGAGAGGGGAGGCACGTCGAGCTTGGCCAGTGACCCAACCCATGATTAG  
AGGCACCTTCAATCCCAACTTTCCTCTCCTCTGCTGGGTACAGTGATGGAACCA  
GCTTCAGGAAGGTAGTATAGACCAGCGTCATCCAATGGAACCATGATCCAAGCC  
ACATATGCAATTTAAAATATTCTAGTAGCCACATTTTTTAAAGTCCAAAGAAACA  
GCTAAAATCAGTGAAATTAATTTTTAGACTACATTTTAAACCTAACATGTCAAAAA  
TAGTATCACTTCAGCATGGAATCAATATAAAAATTACTGGGATATTTTACATTCTT  
TTTTCAAATGAAGTCTTCAAATCCAATGTGATTTTCTCTTAGAAAACATCTCA  
GTCTGGCCCAGCCCTATTTCCAGTGTTCAATAGCCACACCTGACTACTGGTTGCTG  
TATAGGACAGCACGGACTTAGGTTCTTATTAGGAGACTGATGGGGGGGGTCCCT  
CCTGGTGGGTCACTCACTGCCATAGCTCTTGTTCATAGCTGATGAAGGCAGGAGTG  
AGTCTTATTATGTTGGCCTAGAGTAGAAAGCACAGAGCTATGTGAGGCTGCTGT  
CTCAGCCTCTGGAAGTTCTGCTTACCTGCTTAGTAAGAGGAGATGACCACTCCT  
GTGGACTGCATGTCCCATCTGCCCCCAGAGGGGTGTCGGCGCTGCCCCAGTCATGT  
CCCTTATGACCTGTCCAAGTCCTAGAGGCCAAAGCAGGTCATATTCTTCAGCTGC  
AGGAATGTCAGCTACTGCCTCCCACCCCTTAACCTGATCCCCTTATCATATAGTGG  
GGAAGGGGCAGGCAGGCCTTCTCTGTCAAGAACAAAGATCTCTACAACATTTT  
GTCACCTGGGCCAGTCACCTGCTAATATCATCTCACCAATATTTGGAGCTGTTTTT  
TGAATCCCTTAATTTTCTTAAATATTTATCTTAAAGTCAAATGCTATAAAGGAGAT  
ACCCTGGGAAGGGCAGTGGCCACAGGCAGACTGGGTCTCCTAGGAGGTGGTGGT  
GTTGGTGACAAGTTCTACTTGGACTGGGACTCAACCCACCATTGCCTACCTCTCTT  
CCCTGCCTGGAGACCTTCCCTTAGGATTGAAGAAACCTCTTTTGTGTTGTGAAAAAG  
ATAGGTATCGAGATCTTAATGGAGAGAACAGAATAAAATGCAAGGAGCCAACCC  
CTGGGTATTCTCAAAGCATTTCACGGTCAGTATAACAAGGTTTGATTGATTTAA

AATATAACATTCTGAGCCCTGTGTTACTGAGCAAAAATGAGCTGATTTGGTGAGT  
 ATGTTTTATATATGGTCATTAGACAGGGACCATAACTGACAAAACCTCTCAAACGC  
 CTGGAGTGTATGGCCCACCAGATTATTGCTCAGTCAATATAAATTTATTACCT  
 TTATTTTAATTTGCATAGTGCTTTCTGATTGGTCAGACAAGGAGTGGTGTGTACTG  
 CAGGATTCTAACAATGCCTCTGCCCTTGGAGGCAGCAATTCCTGTGGTTATTGGT  
 GCTAAAATAAGATAAAAATATTATGTAAATTTGTTCTGATATGATGTGAATAAATG  
 TGTTGTTTAATCTTAACAAGAATGCTACATCTTATCAGATCTATTGTAAGTGTCTGT  
 TCCTTCTCATAATTAATTAATTACAGGAAAGGCGATTCAAACCAGATCTTGAAAC  
 TATTGTGATGTTCTGAGAGGTAATTTAACAGGGAAGTGGGAGGGGGGATGAAA  
 AGGGAAATTGCCAGGTTCTGTGACTTTGAAAGGACTGAGGAAGCAGAGAGCAT  
 TTGGGGACTTCACTGAAACTGACTGCATCTTGCAATTTTCTTTTTTCGAATTGGCAG  
 AAATATTGATTTCCATTGATTGAAGAAAAACAAGTGTCTGGTAATTAATTAAT  
 GACTTGTTTCATGGAAAAATAAATAATCTGTGAGTTGTGGAATGTAAACTGATTA  
 AACAATTAATAAAGAAGATTATGTTGTGTGTTTTAA

>CDS 1182207.1

ATGGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGCGGCGCGGAGCCGGGCCAGGCTCTG  
 TTCAACGGGGACATGGAGCCCGAGGCCGGCGCCGGCGCCGGCGCCGGCCTCT  
 TCGGCTGCGGACCCTGCCATTCCGGAGGAGGAGAAATTGAGCGATGTACGTACAT  
 CAAATACCACTACTCCTCAGCAACCATCCCCAGGAACCTCACTTTCAATATCACG  
 AAGACCATCCGTCAGGATGAGTGGCATGCCCTACACCTGCGCAGAATGACGGCT  
 GGCTTCATGGGCATGGCGGTGGCCATCATCCTCTTTGGCTGGATCATCGGCGTGC  
 TGGGCTGCTGCTGGGACCGAGGCCTTATGCAGTACGTGGCAGGGCTGCTCTTCT  
 CATGGGAGGAACCTTCTGCATCATTTCACTGTGCACCTGTGTGGCCGGGATCAAC  
 TTTGAGCTGTCACGCTACCCACGCTACCTGTACGGACTCCCTGATGACATCAGCC  
 ATGGCTATGGCTGGTCCATGTTCTGTGCATGGGGGGCCTGGGCCTCACACTCAT  
 CTCGGGATTCTTCTGTACCTTAGCCCCTTCTGTTCAACCTGTCCCAGGACCAACT  
 ACCCTAAATCCAGACCCGAGAATGGGACAGTGTGCTAA

>Fusion\_1\_\_BRAF-TMEM178B\_NP\_004324.2-

XP\_011514007.1\_translation\_of\_CDS\_NP\_004324.2-NP\_001182207.1\_PCO65\_CDS2  
 MAALSGGGGGGAEPGQALFNGDMEPEAGAGAGAAASSAADPAIPEEEKLSDVRTSN  
 TTPQSPGTSLSISRRPSVRMSGMPYTCAE\*RLASWAWRPSSSLAGSSACWAAA  
 GTEALCSTWQGCSSSWE

## APÊNDICE C - Sequências do mRNA; CDS e tradução para a fusão KDM7A-BRAF

>mRNA 17012559.1

AGTCGGCGAGCGGAGTAGCGAGCGAGCGTGTGTGTGTTTTTTAAAGATGGCCGG  
 AGCGGCGGCGGCGGTGGCCGCGGGAGCAGCAGCTGGAGCCGCGCGGCAGCCGT

GTCGGTGGCGGCTCCCGGCCGGGCCTCGGGCGCCTCCGCCGCCCCCGCCCGTGTAC  
TGTGTGTGCCGGCAGCCGTACGACGTGAACCGCTTCATGATCGAGTGCGATATCT  
GCAAGGACTGGTTCCACGGCAGGTGTGGAATATCAAACAAATGATTAAGTTGAC  
ACAGGAACATATAGAGGCCCTATTGGACAAATTTGGTGGGGAGCATAATCCACC  
ATCAATATATCTGGAGGCCTATGAAGAATACACCAGCAAGCTAGATGCACTCCAA  
CAAAGAGAACAACAGTTATTGGAATCTCTGGGGAACGGAAGTATTTTTCTGTTT  
CTAGCTCTGCATCAATGGATAACGTTACATCTTCTCCTCTTCTAGCCTTTTCTAGTG  
CTACCTTCATCTCTTTTCTAGTTTTTCAAATCCCACAGATGTGGCACGGAGCAACCC  
CAAGTCACCACAAAAACCTATCGTTAGAGTCTTCCCTGCCCAACAAACAGAGGACA  
GTGGTACCTGCAAGGTGTGGAGTTACAGTCCGAGACAGTCTAAAGAAAGCACTG  
ATGATGAGAGGTCTAATCCCAGAGTGCTGTGCTGTTTACAGAATTCAGGATGGAG  
AGAAGAAACCAATTGGTTGGGACACTGATAATTTCTGGCTTACTGGAGAAGAATT  
GCATGTGGAAGTGTGGAGAATGTTCCACTTACAACACACAACCTTTGTACGAAAA  
ACGTTTTTACCTTAGCATTTTGTGACTTTTGTGCGAAAGCTGCTTTTCCAGGGTTT  
CGCTGTCAAACATGTGGTTATAAATTTACCAGCGTTGTAGTACAGAAGTTCCAC  
TGATGTGTGTTAATTATGACCAACTTGATTTGCTGTTTGTCTCCAAGTTCTTTGAA  
CACCACCAATACCACAGGAAGAGGGCGTCCTTAGCAGAGACTGCCCTAACATCTG  
GATCATCCCCTTCCGCACCCGCTCGGACTCTATTGGGCCCAAATTCTCACCAGT  
CCGTCTCCTTCAAATCCATTCCAATTCCACAGCCCTTCCGACCAGCAGATGAAG  
ATCATCGAAATCAATTTGGGCAACGAGACCGATCCTCATCAGCTCCCAATGTGCA  
TATAACACAATAGAACCTGTCAATATTGATGACTTGATTAGAGACCAAGGATTT  
CGTGGTGTGAGGCCCTTTGAACCAGCTGATGCGCTGTCTTCGGAAATACCAAT  
CCCGGACTCCCAGTCCCCTCCTACATTCTGTCCCCAGTGAAATAGTGTTTGATTTT  
GAGCCTGGCCCAGTGTTTACAGAGGATCAACCACAGGTTTGTCTGCTACCCCCCTG  
CCTCATTACCTGGCTACTAATAACGTGAAAGCCTTACAGAAATCTCCAGGACC  
TCAGCGAGAAAGGAAGTCATCTTCATCCTCAGAAGACAGGAATCGAATGAAAAC  
ACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCCTGATGGGCAGATTACA  
GTGGGACAAAGAATTGGATCTGGATCATTGGAACAGTCTACAAGGGAAAGTGG  
CATGGTGTGATGTGGCAGTGAAAATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGT  
TACAAGCCTTCAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATA  
TCCTACTCTTCATGGGCTATTCCACAAAGCCACAACCTGGCTATTGTTACCCAGTGG  
TGTGAGGGCTCCAGCTTGTATCACCATCTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGA  
TGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACAGACTGCACAGGGCATGGATTACTTACA  
CGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAATAATATATTTCTTCATGAA  
GACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGATGGA  
GTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGA  
AGTCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATATGCA  
TTTGAATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCAAACATCAA  
CAACAGGGACCAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGATCTC  
AGTAAGGTACGGAGTAACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGC  
CTCAAAAAGAAAAGAGATGAGAGACCACTTTTCCCAAGAGAATTTGCAGCCTT  
CAAGTAGCCACCATCATGGCAGCATCTGCTCTTATTTCTTAAGTCTTGTGTTTCGTA  
CAATTTGTTAACATCAAACACAGTTCTGTTCTCAAATCTTTTTTTAAAGATACA  
AAATTTCCAATGCATAAGCTGATGTGGAACAGAATGGAATTTCCCATCCAACAAA

AGAGGAAAGAATGTTTTAGGAACCAGAATTCTCTGCTGCCAGTGTTTCTTCAACA  
AAAATACCACGAGCATAACAAGTCTGCCAGTCCCAGGAAGAAAGAGGAGAGACC  
CTGAATTCTGACCTTTTGATGGTCAGGCATGATGGAAAGAACTGCTGCTACAGC  
TTGGGAGATTTGCTATGGAAAGTCTGCCAGTCAACTTTGCCCTTCTAACCACCAG  
ATCAATTTGTGGCTGATCATCTGATGGGGCAGTTTCAATCACCAAGCATCGTTCTC  
TTTCTGTTCTGGAATTTTGTGGAGCTCTTTCCCCTAGTGACCACCAGTTAGTT  
TCTGAGGGATGGAACAAAAATGCAGCTTGCCCTTTCTATGTGGTGCCTGTTTCAGG  
CCTTGACAGATTTTATCAAAAGGAACTATTTTATTTAAATGGAGGCTGAGTGGT  
GAGTAGATGTGTCTTGGTATGGAGGAAAAGGGCATGCTGCATCTTCTTCCCTGACC  
TCCGGGGTCTCTGGCCTTTTGTTCCTTGCTCACTGAGGGGTCTGTCTAACCAAGC  
AGGCTAGATAGTGCTGGCACACATTGCCTTCTTTCTCATTGGGTCCAGCAATGAA  
GATAAGTGTGGGTTTTTTTTTTTCTCCACAATGTAGCAAATTTCTCAGGAAAT  
ACAGTTTATATCTTCCCTCCTATGCTCTTCCAGTCACCAACTACTTATGCGGCTACT  
TTGTCCAGGGCACAAAATGCCGTGGCAGTATCTAACTAAACCCCCACAAAAGTGC  
TTAATAACAGTTTTGAATGTGAGAAATTTAGATAATTTAAATATAAGGTACAGGT  
TTTAATTTCTGAGTTTCTTCTTTTCTATTTTTATTTAAAAGAAAATAATTTTCAGAT  
TTAATTGAATTGGAAAAACAATACTTCCCACCAGAATTATATATCCTGAAAAT  
TGTATTTTTGTTATATAAACAACTTTTAAGAAAGATCATTATCCTTTTCTCTACCTA  
AATATGAGGAGTCTTAGCATAATGACAAATATTTATAATTTTTCAATTAATGGTA  
CTTGCTGGATCCACACTAACATCTTTGCTAATAATCTCATTGTTTCTTCCAAGTGA  
TTCCCTAACACTATATCCACATCTTCTTTCTAGTCTTTTATCTAGAATATGCAACCT  
AAAATAAAAATGGTGGCGTCTCCATTCATTCTCCTTCTTCTTCTTTTCCCAAGCCT  
GGTCTTCAAAGGTTGGGCAATTTGGCAGCTGAATCCCAGACAGAGAATAGAG  
CAATTTTAGGGATATTAGGACTGAGGGAGGGTGTGGGAAAGCTGTCATCAGTTGT  
TTTTATAGAAAGAACTGGCATTCAATTAAGAACCTAAATCTTATCTTTGCACAAAT  
GGAAAATATAACCTAGTTATAGCTTCCTTTGGCCTTTATTAAGGGTAATATCAAT  
CACAGTCATAGCAAAGAAAGCGGATGTATTAATGGCAAATTAATGGAAAACCTC  
CCTTATCAGGAATCTAGACTCAGAATTTAGGAACACAAATCAAATCAGACCAACC  
AAGCTATAGCCAAGGACTTGAAAGAAATTAACAAGACCCAGAATAAATCAAGG  
AATTAGAAATTGTTATTTAAAATTTTCAGATTGTAACCTCAGGCCCTGCTGTCTAT  
ATTGCAGCCACTAAAAGCTCACTACCATTAGATTTTTGCTAACATACATGTATTCA  
GAAGAAAGCCTATTGAAATTTTCATTGTCTTGTAAGGTTGTCCTAGTAAAATG  
GAAAAGATCCTTAAGTTATTAATCAGTTTGAAAAGCAAATTTGTTTTTAAGTTTTA  
CATCAGCAGGGCAGTGTCTTACAAAATTCAGAAATTGCAAAGGTGGAAATAATTC  
ACGCTGATTTGAAGAACATCTTCTGTGCAATAATACTGCCTCTCTTGAAAAGCATT  
GGCTGTTTTTTCTTTTTAAATATATCTCTAGATGCTTTTAAATGTGGCTGTGTTCCC  
TTACCAAGATTGGCTTCAAGTTTCCGCAGGTAGAGAGACCTGGGCTTGAACAAG  
AGGATGTGTTTCATGTCCTGCTGAGGAGGTAGAACATGTGCAGCCTGGGTCCGGG  
ACTGCCTCCGTGGGGCAGGGGCAGGGGCGGTACCATTAGGGAGGAAGCTTAGCA  
TTTCAGTTTCTTAAACAATATTCAGGGTGATACACTTTTTCTTCCCTTGCATTTTAG  
AATAGGCTGGTATCTCATTTGAACGGGGGAGCAGACTTGATCTCAAATGAAGCTG  
TGCCAGGAGCCAGGCTTAGCATATTGAGATTTTTATAGATACCTTAAAAAATAA  
AATATTTAAACCTCTCTTTTCTTCTTTTCTATGAAATAGGTTTTTTCTCTAGTTT  
ACAAATGACATGAAAATAGGTTTTATTTGTGTTTTATCTGCTTTATTTTTTGATGCT

TAGACAACAGTTAGACTTACTGAGCTCCTAAAAAACGAGGAAGAAGTCCTTATT  
TGTGAAAAGCACTTTATGAGTAATTGTATAGACAGTATGTGGCTGCGTCACTGAT  
CATCTTGTAAAGGGTGTAAACAGTCTTGTCTGTAAAGTGGCTGCAGTGCCTTCTGTAG  
TGTGTTTTATTTTTGGTAGGGAGAGGTGAAGCCTTCTGAAAAATTTGAGAGCAAC  
TACAGAGGATTGTTTGTAACTGTGTAGTATTCCTGATGGACTTTTTTCATCGTTAG  
AGTCAAGGACCTAGACTTTTGCCACTGAAATAATATTGACCAAAAAAATAGTTTA  
TAAAAGGGATTTGTGAATAGAAAATTCAGTGTGATCATTTGTTGTTAATGTGCAC  
CTTAAAAGAAGATTCTGTCTAGCTGTCAAATTCTGGTTCCCGAATATCTCACCCCT  
GATTGTATTTGAGATCTAGTAGGGCATACTGGGGCATTTTAGAAAGATAAAATCCC  
ATACAAATGATATATGCTATATTTATGTTGGTGTGGAGAAGAAAGAGCAGTATA  
TAAAGAAATAATTCAAGACTGCAGCACTGTCAACCTGAACTTTGTAATATTTTC  
CTAGCTTCTGGTTTGGTGCAGTGCAGCACTTTCATCACAGGATGTTACCTTGTAT  
TCACCAGGCGGAGTGCAGCTGCTGCACATCCTCCTCAGATCTCACCTGTCCCA  
CTGTACATCCACCCGCCAGCTGCTTGCAAACCTCATCTCTAGCTTTAGTTCGAAAC  
CACATTGCAGGGTTCAGGTGACCTCTACAAAAAATACCTCTTCAGAATGAGGTA  
ATGAATAGTTATTTATTTTAAAATATGAAAAGTCAGGAGCTCTAGAACATGACGA  
TGATTTAAGATTTTAACTTTTTTGTGTACTTGTATTTGAGCACTCTCATTTTGTCCCT  
AAAGGGCATTATACATTTAAGCAGTAATACTGTAAAAAATGTGTTGCTCGGAAT  
ATCTGAATGTTGTTGAAAGTGGTGCCAGAACCGGTTTAGGGGTACGTTTCAGAAT  
CTAACCTTGAGTCAATTGCATGAAATTAATAGCTGTGGTATCACTTCACTAAC  
AGTGATGTAATTTTAAATTTTTCAGTAGGCTTGGCATGACAGTACATCCTCATAATGA  
GTTTGTGCTGAGCTTTGTACATGCACAGGCATTCATAGAAAGACCACCCAGCTAA  
GAGGGTAGAATGATTACTCTTTTTGCAAGATTCTCTTCTTTGTCCAAGTTGGCATT  
GTTAGTGCTAGGAATACCAGCACCTTGAGACGAGCAGATTCCAACCATTAGGCTA  
TAAACACCATAGCCAGAGATGGAAGGTTTACTGTGAGTATGAACAGCAAATAGC  
TTACAGGTCATGAGTTGAAATGGTGTAGGTGAGGCTCTAGAAAAATACCTTGACA  
ATTTGCCAAATGATCTTACTGTGCCTTCATGATGCAATAAAAAAGCTAACATTTTA  
GCAGAAATCAGTGATTTGTGAAGAGAGCAGCCACTCTGGTTTAACTCAGCTGTGT  
TAATAATTTTTAGAGTGCAATTTAGACTGCATAGGTAAATGCACTAAAGAGTTTA  
TAGCCAAAATCACATTTAACAATGAGAAAACACACAGGTAAATTTTCAGTGAAC  
AAAATTATTTTTTAAAGCACATAATCCCTAGTATAGTCAGATATATTTATCACAT  
AGAGCAACTAGGTTGCAAATATAGTTCAGTGACATTTCTAGAGAACTTTTTCTA  
CTCCCATAGGCTCTTCAAAGCATGGAACTTTTATACAACAGAAATGTTGACAGAA  
ATTGCTGTAGTTTAGGGTTGAAGTACTGTATGATGGGCAGCAATCATGTATTAAC  
TTAGAAGGGGAAATTGAAATATAGGACCGAATTTGGTTTTATCAGTTTCCAGAGT  
ACTGCTGCCAACCTAGACACTGATTTTTTCAGAGTTTGAATGTAAATTTCTTCCCG  
GGACTTGATTGCACATGAAGCTGGACTGCGTTAGTCATCCTGTCCCAAAGCGCTG  
TGGGGGCCAGGGTGGAGGTCTCAAGGCATCCTTTATGACCTGGCCATTGGATGTA  
AAAGAAAACATATCCATGCTGTGGTTCTTGTATCTTGTTTCATTCTCACCATTG  
AAAGAGAAAGTCCATGTATTGTCTCCAGCACATCCTTGAAATGTTATACTGGGAT  
GGATTACTGATGCCATCGGTAGTTGAGCCCAGAAGAGGGTAGTAGCATCTCTG  
CCTCAGGTGATGATTTGTAGCTTGGCCAGAGGAGAGCGGAGTCACCAGTATATCT  
GTGGTCCATGTTGCTAGCTCTGGTAAAATTAATAAATACTGGTAAGATGTTTGT  
ATTAGTACACTAGACAGTAAGCTCTGTTTTGTTGTTTTCAAATAACCTATTTTAC

TTTTGTGGGGCAAAGACATTTAAATTGAAATTCAATTCTAATTTTTGTTAATTGT  
 GGAAAGGGTAATTAACAGTTCCTATCAGGTATTTTTAATGTGGAAAAGGACAGAA  
 ACCCAACTCCTAAAATCTTAAATTAAGGTAACAGTGCTTTAAAAAATAATGC  
 ATGGGGCAATTAGTCGGCAACTCAATGAGTGACTAAAGTACTTTTATTTAACATC  
 CACAACCTCAACTGTAAAGTTTTATTAATTACTAAATCAGCTTTATTAATAATGTTG  
 ACATTTATTTAGCTATTTTGAATAATTATAGTGACTTGACGAGTGTGTATGAGGAC  
 ACAGCCAATGTAAGCCAGTGTATCCATTTTTTAGAGGTGCATTTTTTTTTTAAAGAA  
 TTCTGTAGATAGAAGTGCTCTGAAAACAATAAAATATGTTTATTCATGGTAGTA  
 TCAAAAATGTTTGTACAAACCATCTGCTTCTCCCGGCCAGCCGAGTTCATTCTCC  
 AGCACCGTGACCGCTGGTTCTCATGTACAGCACATATGCGGGAGAGTTGGCAGAA  
 AATTTGTGAAGAGATGCCGCAAAGGAAGGGTCTGTTGACGGGTGGGATTGGGGG  
 TTTTGATGAAGTTGCTTAGTCCTGGTTTTGTTTTGAAAATTACTGCGTTGCATTTTT  
 GTGTTAAGTTTTTGAACCCACGTGTGTTTTGGTGGAGTATGAGTTGGAAGTCACTG  
 CAACTAGCATAAACAACAAGCTCACAGAGTAGGCACAGATGTAGAGAACAGA  
 GACCAAAATGGGGTGAGGTGGCAGTAAATCTAGGATAGGGAAAAATTAATGTGA  
 GGGTGGGAAATAAACTGTAATTACCTGAAATCAAATGTAAGAGTGCAATAAGTA  
 TGCTTTTTATTCTAAGCTGTGAACGGTTTTTTAAGAATCATTCTTCCTAATACAT  
 TTGTGTATGTTCCATAGCTGATTAACCAGCTATATCAACATATAATGCCTTTTT  
 ATTCATGTTAATGACCAACGTAAGTGGCTAGCCTTTATGTCTTATTTATCTTCATG  
 TTATGTTAGTTTACATACAGGGGTGTATGTCTCTGTGCTGTCCCCTTCTCCTGCCTT  
 CATTTTAAAATGCATCCATGGGTCCTCCGTGTTTCTTTGGCCATGCCACATATAT  
 AGACTCAGTTTGGCCTTCATGATATCGCCTGATTTTTGAGGACTGTATCACAGTGA  
 TATGTATTTGTGGTAATCTCATTGTTGGTTGTACATCTGATCCTTTCCTCAACATG  
 GCAATTGCTGCCTTTCCTAAGATAGGATCATACAACTGATCAGGGGATTGAATTT  
 GATCATTCAACATGTGTCTCTGAATTTTATTCAGTAGTTGTCATTGCTCTTTG  
 GTTAGACCAAGAAAAAGGAAATCCCCCTTTTCATGTATTCCTGGTTTGAGGA  
 CATGACTCCTGTAAGGGAGAGGAAAGGGAGATGCTTCCTGTTTGAACCTGCAGTGA  
 ATTCACGGTTCCTGTTTCACTCCAAACCTTATGGCGACTCACACACACATTCC  
 TCTTTCTGTTACTGCCAAAGGTTCCGGTTTAGTACACTTCAGTTCCACTCAAGCA  
 TTGAAAAGGTTCTCGTGGAGTCTGGGGCGTGCCAGTGAAAAGATGGGGACTTTT  
 TAATTGTCCACAGACCTCTCTATACCTGCTTTGCAAAAATTACAATGGAGTAACT  
 ATTTTTAAAGCTTATTTTTCAATTCATAAAAAAGACATTTATTTTCAGTCAAATGG  
 ATGATGTCTCCCTCTTTCCCTATTCTCAATGTTTGCTTGAATCTTTTATTATTTTT  
 TTTAATTTCCCCCATACCCACTTCTGATACTTTGGTTCTCTTTCCTGCTCAGGTC  
 CCTTCATTTGTACTTTGGAGTTTTTCTCATGTAAATTTGTATAACAGAAAATATTG  
 TTCAGTTTGGATAGAAAGCATGGAGAATAAAAAAAGATAGCTGAAATTCAGATT  
 GAAGAAATTTATTTCTGTGTAAAGTTATTTAAAAACTGTATTATATAAAAGGCAA  
 AAAAAGTTCTATGTACTTGATGTGAATATGCGAATACTGCTATAATAAAGATTGA  
 CTGCATGGAGAAGTC

>CDS 16868048.1

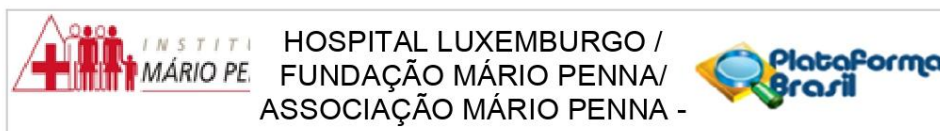
ATGGCCGGAGCGGCGGGCGGGTGGCCGCGGGAGCAGCAGCTGGAGCCGCCGCG  
 GCAGCCGTGTCGGTGGCGGCTCCCGGCCGGCCTCGGCGCCTCCGCCGCCCCCGC

CCGTGTA CTGTGTGTGCCGGCAGCCGTACGACGTGAACCGCTTCATGATCGAGTG  
CGATATCTGCAAGGACTGGTTCCACGGCAGGTGTGGAATATCAAACAAATGATTA  
AGTTGACACAGGAACATATAGAGGCCCTATTGGACAAATTTGGTGGGGAGCATA  
ATCCACCATCAATATATCTGGAGGCCTATGAAGAATACACCAGCAAGCTAGATGC  
ACTCCAACAAAGAGAACAACAGTTATTGGAATCTCTGGGGAACGGAACTGATTTT  
TCTGTTTCTAGCTCTGCATCAATGGATACCGTTACATCTTCTTCTCTTCTAGCCTT  
TCAGTGCTACCTTCATCTCTTTTCAGTTTTTCAAATCCCACAGATGTGGCACGGAG  
CAACCCCAAGTCACCACAAAAACCTATCGTTAGAGTCTTCTGCCCCAACAAACAG  
AGGACAGTGGTACCTGCAAGGTGTGGAGTTACAGTCCGAGACAGTCTAAAGAAA  
GCACTGATGATGAGAGGTCTAATCCCAGAGTGCTGTGCTGTTTACAGAATTCAGG  
ATGGAGAGAAGAAACCAATTGGTTGGGACACTGATATTTCTGGCTTACTGGAGA  
AGAATTGCATGTGGAAGTGTTGGAGAATGTTCCACTTACAACACACAACCTTTGTA  
CGAAAAACGTTTTTTCACCTTAGCATTTTGTGACTTTTGTGAAAGCTGCTTTTCCA  
GGGTTTCCGCTGTCAAACATGTGGTTATAAATTTACCAGCGTTGTAGTACAGAA  
GTTCCACTGATGTGTGTTAATTATGACCAACTTGATTTGCTGTTTGTCTCCAAGTT  
CTTTGAACACCACCAATACCACAGGAAGAGGGCGTCTTAGCAGAGACTGCCCTA  
ACATCTGGATCATCCCCTTCCGCACCCGCCTCGGACTCTATTGGGCCCAAATTCT  
CACCAGTCCGTCTCCTTCAAATCCATTCCAATCCACAGCCCTTCCGACCAGCAG  
ATGAAGATCATCGAAATCAATTTGGGCAACGAGACCGATCCTCATCAGCTCCCAA  
TGTGCATATAAACACAATAGAACCTGTCAATATTGATGACTTGATTAGAGACCAA  
GGATTTTCGTGGTGTGGAGCCCCCTTTGAACCAGCTGATGCGCTGTCTTCGGAAAT  
ACCAATCCCGGACTCCCAGTCCCCTCCTACATTCTGTCCCCAGTGAAATAGTGTTT  
GATTTTGAGCCTGGCCCAGTGTTTCAGAGGATCAACCACAGGTTTGTCTGTACCC  
CCCCTGCCTCATTACCTGGCTCACTAACTAACGTGAAAGCCTTACAGAAATCTCC  
AGGACCTCAGCGAGAAAGGAAGTCATCTTCATCCTCAGAAGACAGGAATCGAAT  
GAAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCTGATGGGCA  
GATTACAGTGGGACAAAGAATTGGATCTGGATCATTGGAACAGTCTACAAGGG  
AAAGTGGCATGGTGTGATGTGGCAGTAAAATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCT  
CAGCAGTTACAAGCCTTCAAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACAT  
GTGAATATCCTACTCTTCATGGGCTATTCCACAAAGCCACAACCTGGCTATTGTTAC  
CCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTGTATCACCATCTCCATATCATTGAGACCAAA  
TTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACAGACTGCACAGGGCATGGATT  
ACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAATAATATATTTCT  
TCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCT  
CGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGG  
CACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGT  
ATATGCATTTGGAATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATCAA  
ACATCAACAACAGGGACCAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCC  
AGATCTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGC  
AGAGTGCCTCAAAAAGAAAAGAGATGAGAGACCACTCTTCCCAAGAGAATTT  
GCAGCCTTCAAGTAGCCACCATCATGGCAGCATCTGCTCTTATTTCTTAAGTCTTG  
TGTTTCGTACAATTTGTTAACATCAAAACACAGTTCTGTTTCTCAAATCTTTTTTTA  
AAGATACAAAATTTCCAATGCATAAGCTGA

>Fusion\_1:\_KDM7A-BRAF\_translation\_of\_CDS\_NP\_085150.1-

NP\_004324.2\_PCO37\_CDS1MAGAAAAVAAGAAAGAAAAAVSVAAPGRASAPPPPPP  
VYCVCRQPYDVNRFMIECDICKDWFHGRCGISNK\*LS\*HRNI\*RPYWTNLVGSIIHHQ  
YIWRPMKNTPAS\*MHSNKENNSYWNLWGTELIFLFLALHQWIPLHLLPLLAFCYLH  
LFQFFKIPQMWHGATPSHHKNLSLESSCPTNRGQWYLQGVELQSETV\*RKH\*\*\*EV\*S  
QSAVLFTEFRMERRNQLVGTLIFPGLLEKNCMWKCWRMFHLQHTTLYEKRFSP\*HFV  
TFVESCFSRVSAVKHVVINFTSVVVQKFH\*CVLIMTNLICCLSPSSLNTTQYHRKRRP\*  
QRLP\*HLDHPLPHPPRTLLGPKFSPVRLQNPFQFHSPSDQQMKIIEINLGNETDPHQLP  
MCI\*TQ\*NLSILMT\*LETKDFVVMEDQPQVCLLPPLPHYLAH\*LT\*KPYRNLQDLSEK  
GSHLHPQKTGIE\*KHLVDGTRVMIGRFLMGRLQWDKELDLHLEQSTRESGMVMW  
Q\*KC\*M\*QHLHLSSYKPSKMK\*EYSGKHDM\*ISYSSWAIPQSHNWLLLPSGVRAPACI  
TISISLRPNLR\*SNL\*ILHDRLHRAWITYTPSQSSTETSRVIIYFFMKTSQ\*K\*VILV\*LQ\*  
NLDGVGPISLNSCLDPFCGWHQKSSECKIKIHTAFSQMYMHLELFCMN\*\*LDSYLIQT  
STTGTR\*FLWWDEDTCLQISVRYGVTVQKP\*RD\*WQSASKRKEMRDHSFPKFSPLLS  
CWPAHCQKFTA VHQNPP\*IGLVSKQRILVYMLVLLQKHPSRQGDMMVRFLST

## ANEXO A - Aprovação do comitê de ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE PAINÉIS DE BIOMARCADORES COMO INSTRUMENTOS PREDITIVOS DE PROGNÓSTICO E RESPOSTA CLÍNICA AO TRATAMENTO DO CÂNCER DO COLO UTERINO, OVÁRIO E MAMA: ESTRATÉGIA PARA UMA ONCOLOGIA PERSONALIZADA

**Pesquisador:** PAULO GUILHERME DE OLIVEIRA SALLES

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 3

**CAAE:** 82703418.8.0000.5121

**Instituição Proponente:** ASSOCIACAO MARIO PENNA

**Patrocinador Principal:** ASSOCIACAO MARIO PENNA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.482.025

#### Apresentação do Projeto:

DESENVOLVIMENTO DE PAINÉIS DE BIOMARCADORES COMO INSTRUMENTOS PREDITIVOS DE PROGNÓSTICO E RESPOSTA CLÍNICA AO TRATAMENTO DO CÂNCER DO COLO UTERINO, OVÁRIO E MAMA: ESTRATÉGIA PARA UMA ONCOLOGIA PERSONALIZADA.

Parecer consubstanciado Número 2.481.746 d 1º de fevereiro de 2018.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivos previamente avaliados e aprovados no parecer consubstanciado Número 2.481.746 d 1º de fevereiro de 2018.

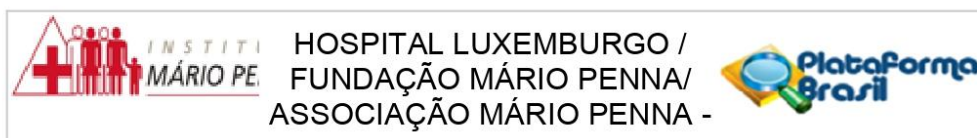
#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios previamente avaliados e aprovados no parecer consubstanciado Número 2.481.746 d 1º de fevereiro de 2018.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Comentários e Considerações pertinentes ao estudo foram previamente descritos no parecer consubstanciado Número 2.481.746 d 1º de fevereiro de 2018.

**Endereço:** Rua Gentios, nº 1420  
**Bairro:** Luxemburgo **CEP:** 30.380-472  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3299-9980 **Fax:** (31)3299-9943 **E-mail:** comiteetica@mariopenna.org.br



Continuação do Parecer: 2.482.025

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE foi elaborado de acordo com as solicitações de adequação pontuadas no parecer consubstanciado Número 2.481.746 d 1º de fevereiro de 2018.

**DECLARAÇÃO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** de acordo, porém solicita-se corrigir o nome do projeto (É "Desenvolvimento..." e não "Descoberta...").

**CARTA DE ANUÊNCIA:** de acordo, porém solicita-se corrigir o nome do projeto (É "Desenvolvimento..." e não "Descoberta...").

**ORÇAMENTO:** de acordo, porém informações de valores estão divergentes no projeto de pesquisa (páginas 5 e 6).

**Recomendações:**

Recomenda-se:

- Realizar adequações no título do projeto na Declaração de Compromisso do Pesquisador;
- Realizar adequações no título do projeto na Carta de Anuência;
- Realizar adequações no projeto de pesquisa quanto ao orçamento previsto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conclui-se que as recomendações indicadas para correção não impedem a aprovação do projeto de pesquisa para início da mesma, sendo assim o projeto será considerado como aprovado. Solicita-se o envio dos documentos com as correções das inadequações indicadas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o CEP do Instituto Mario Penna, de acordo com as atribuições definidas na Resolução 466/12 e na Norma Operacional 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa supracitado.

Recomendamos envio de relatórios semestrais a respeito do estudo ao CEP do IMP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1067815.pdf	01/02/2018 15:14:54		Aceito
TCLE / Termos de	TCLESubmissaoCEP.pdf	01/02/2018	PAULO GUILHERME	Aceito

**Endereço:** Rua Gentios, nº 1420

**Bairro:** Luxemburgo

**CEP:** 30.380-472

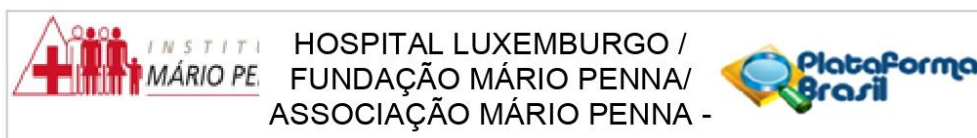
**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3299-9980

**Fax:** (31)3299-9943

**E-mail:** comiteetica@mariopenna.org.br



Continuação do Parecer: 2.482.025

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLESubmissaoCEP.pdf	15:14:40	DE OLIVEIRA SALLES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PRONON_12_2015.pdf	25/01/2018 16:40:15	PAULO GUILHERME DE OLIVEIRA SALLES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Compromisso.pdf	25/01/2018 16:34:38	PAULO GUILHERME DE OLIVEIRA SALLES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Anuencia_SES.pdf	25/01/2018 16:34:31	PAULO GUILHERME DE OLIVEIRA SALLES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Anuencia_IMP.pdf	25/01/2018 16:34:23	PAULO GUILHERME DE OLIVEIRA SALLES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_PRONON.pdf	25/01/2018 16:34:05	PAULO GUILHERME DE OLIVEIRA SALLES	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 01 de Fevereiro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Stella Sala Soares Lima**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Gentios, nº 1420  
**Bairro:** Luxemburgo **CEP:** 30.380-472  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3299-9980 **Fax:** (31)3299-9943 **E-mail:** comiteetica@mariopenna.org.br